ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLAERUNG VON NEUEN METABOLITEN EINER PHOMA-SPECIES

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Margareta Séquin-Frey
aus Basel und Thun BE

Basel 1970

ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLAERUNG VON NEUEN METABOLITEN EINER PHOMA-SPECIES

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
Margareta Séquin-Frey
aus Basel und Thun BE

Basel 1970

Teningen/Baden, 1970
Heinrich Blum – Offsetdruck

Genehmigt von der Philosophisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren

Dr. Ch. Tamm
Dr. C.A. Grob

Basel, den 28. April 1970

Prof. Dr. S. Fallab
Dekan

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen lieben Eltern in
Dankbarkeit und meinem
lieben Gatten gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Laboratorien des Instituts für Organische Chemie der Universität Basel unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ch. Tamm ausgeführt.

Herrn Professor Tamm danke ich herzlich für das grosse Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat, für seine stete Hilfsbereitschaft und für das angenehme Arbeitsverhältnis.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	THEORETISCHER TEIL	1
I.	Einleitung und Problemstellung	1
II.	Untersuchung von zehn Stämmen verschiedener Phoma - Arten	3
	1. Züchtung und Extraktion	3
	2. Orientierende Untersuchung der Rohextrakte	6
III.	Die Metabolite der Phoma spec. Stamm S 729	10
	1. Phoma species Stamm S 729	10
	2. Isolierung der Metabolite	10
	3. Strukturaufklärung der Metabolite	11
	3.1. Gentisinalkohol	11
	3.2. Toluhydrochinon	12
	3.3. Gentisinacetal	13
	3.3.1. Eigenschaften und Struktur des Metaboliten	13
	3.3.2. Synthese	19
	3.3.3. Diskussion	20
	3.4. Chlorogentisinalkohol	20
	3.4.1. Eigenschaften und Struktur des Metaboliten	20
	3.4.2. Synthese der drei isomeren Chlorogentisinalkohole	24
	3.4.3. Diskussion	32
	4. Zur Biosynthese der isolierten Stoffwechselprodukte	34

Seite

5. Die antimikrobielle Aktivität von Gentisinacetal und Chlorogentisinalkohol 39

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines 41

2. Züchtung und Extraktion der Stämme S 455, S 567, S 625, S 729, S 749, S 1527, S 1638, S 2276, S 2975 und S 3209 von P h o m a sp. 42

3. Bildungskurve der Metabolite 43

4. Isolierung der Metabolite der P h o m a species Stamm S 729 44

5. Charakterisierung der isolierten Stoffe 46

5.1. Gentisinalkohol 46

5.2. Toluhydrochinon 47

5.3. Gentisinacetal 47

5.3.1. Charakterisierung 47

5.3.2. Hydrolytische Spaltung 48

5.3.3. Synthese 49

5.4. Chlorogentisinalkohol 50

6. Synthese der drei isomeren Chlorogentisinalkohole 50

6.1. Die drei isomeren Chlorogentisinaldehyde 50

6.2. Die drei isomeren Chlorogentisinalkohole 53

C. ZUSAMMENFASSUNG 55

D. LITERATURVERZEICHNIS 57

E. CURRICULUM VITAE 59

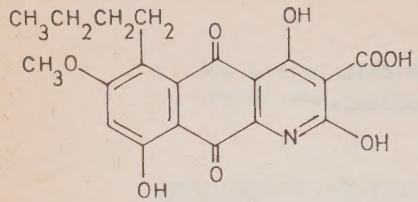
A. THEORETISCHER TEIL

I. Einleitung und Problemstellung

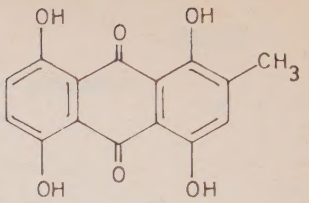
Der Mikroorganismus Phoma, Gattung Phoma, gehört der Klasse der Fungi imperfecti, Ordnung Phomales, Familie Sphaerioidaceae, Subfamilie Hyalosporae an.

Phoma ist chemisch bisher noch nicht sehr gut untersucht worden. Es sind lediglich die folgenden Metaboliten bekannt: Phomazarin (1), ein Azaanthrachinonderivat [1], Cynodontin (2), ein 1,4,5,8-Tetrahydroxy-2-methyl-anthrachinon [2], Gentisinalkohol (3) [3] und das verwandte Epoxydon (4) [3], p-Hydroxybenzaldehyd (5) [4] und Tyrosol (6) [4] sowie Phomin (7) [5] und 5-Dehydrophomin (8) [5]. Die Strukturformeln dieser Verbindungen sind in Formelschema 1 zusammengestellt. Sie lassen sich in drei Gruppen einteilen: 1. Anthrachinonderivate, 2. einfache Benzolabkömmlinge und 3. Makrolide, deren Lactonring an ein hochsubstituiertes heterocyclisches Ringsystem angegliedert ist.

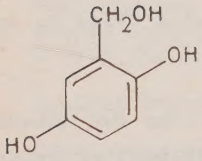
Im Rahmen der Arbeiten über die Strukturaufklärung und Biogenese des Phomins (7) [4] [6] war die Untersuchung weiterer Stämme von Phoma erwünscht, in der Hoffnung, verwandte Metabolite zu finden, die Aufschluss über die biogenetischen Zusammenhänge erteilen würden. Zu diesem Zwecke wurden zehn neue Phoma-Stämme auf den Gehalt an Phomin (7), 5-Dehydrophomin (8) und verwandte Verbindungen geprüft. In keinem der untersuchten Stämme wurde jedoch Phomin oder 5-Dehydrophomin gefunden. Hingegen liess das Dünnschichtchromatogramm des Rohextraktes einer der zehn Phoma-Kulturen (Stamm S 729) die Anwesenheit von Gentisinalkohol (3) und grössere Mengen weiterer Metabolite vermuten. Daher wurde dieser Pilzstamm einer genaueren chemischen Prüfung unterworfen.



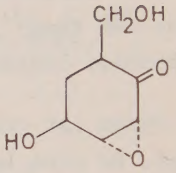
1



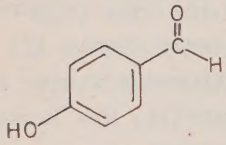
2



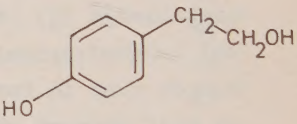
3



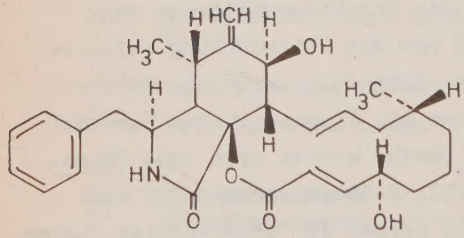
4



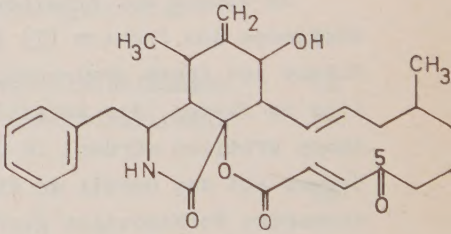
5



6



7



8

FORMELSCHEMA 1

II. Untersuchung von zehn Stämmen verschiedener Phoma-Arten

1. Züchtung und Extraktion

Von der Firma Sandoz A.G. wurden uns in verdankenswerter Weise die Stämme Phoma S 455, S 567, S 625, S 729, S 749, S 1527, S 1638, S 2276, S 2975 und S 3209 als Agarkulturen zur Verfügung gestellt.

Zur Vermehrung des Pilzmaterials wurden sämtliche Stämme auf die gleichen Agarmedien überimpft und bei den angegebenen Temperaturen inkubiert (vgl. Tabelle 1). Alle Kulturen zeigten gutes Wachstum.

Für die Kulturversuche wurde für jeden Stamm ein Ansatz von 10 Erlenmeyern à 500 ml mit 100 ml Malz-Hefe-Pepton-Nährlösung im Autoklaven sterilisiert. Durch Aufschwemmen der Agarkulturen mit Natriumlaurylsulfonatlösung wurden Sporensuspensionen hergestellt, mit denen die Beimpfung der Nährlösungen erfolgte. Je fünf Erlenmeyer eines Stammes wurden als Standkulturen, die andern fünf Gefässe als Schüttelkulturen in der Regel bei 27° inkubiert. Für weitere Inkubationsbedingungen und Ausbeuten der gewonnenen Essigesterextrakte verweisen wir auf Tabelle 2. Mit Ausnahme der Standkulturen von Stamm S 625 und den Schüttelkulturen von Stamm S 2975 wuchsen alle Organismen gut an. Besonders rasches Wachstum zeigten die Stämme S 455, S 729 und S 3209.

Sobald sich eine feste Myceldecke gebildet bzw. starke Knollenbildung in den Schüttelkulturen eingesetzt hatte, wurden die Kulturlösungen von den Mycelien abfiltriert. Die Extraktion der Kulturfiltrate mit Essigester lieferte dunkelbraune, ölige Rohextrakte.

Tabelle 1:

Agarkulturen von Stämmen der Gattung Phoma

Stamm	Inkubationsbedingungen		
	Medium	Temperatur	Inkubationszeit in Tagen
S 455	35[1)]	27°	8
S 567	35	27°	6
S 625	35	ca.25°	8
S 729	35	27°	6
S 749	35	27°	8
S 1527	35	27°	6
S 1638	1[2)]	27°	12
S 2276	36[3)]	27°	8
S 2975	1	18°	13
S 3209	36	27°	8

1) Medium 35: Pro Liter: 20 g Malzextrakt, 4 g Hefeextrakt, 20 g Fadenagar

2) Kartoffeldekokt-Agar: Pro Liter: 250 mg NH_4NO_3, 120 mg KH_2PO_4, 100 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4 g $CaCO_3$, 30 g Glucose, 250 mg Pepton, 25 g Fadenagar, Kartoffeldekokt.

3) Medium 36: Pro Liter: 2 g KH_2PO_4, 2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 g Glucose, 2 g Malzextrakt, 2 g Pepton, 2 g Hefeextrakt, 20 g Fadenagar.

Tabelle 2:

Kulturansätze auf Nährlösungen

Stamm	Menge Kulturbrühe in ml	Inkubationsbedingungen Temp.	Inkubationsbedingungen Inkubationszeit in Tagen	Gewicht des Essigesterextraktes in mg
S 455 Standkultur	500	27°	10	65
Schüttelk.	500	27°	10	50
S 567 Standkultur	500	27°	10	66
Schüttelk.	500	27°	10	72
S 625 Schüttelk.	500	27°	17	22
S 729 Standkultur	500	27°	6	711
Schüttelk.	500	27°	6	704
S 749 Standkultur	500	27°	10	27
Schüttelk.	500	27°	10	19
S 1527 Standkultur	500	27°	10	28
Schüttelk.	500	27°	10	25
S 1638 Standkultur	1000	27°	10	--
S 2276 Standkultur	500	27°	17	63
Schüttelk.	500	27°	17	72
S 2975 Standkultur	1000	18°	10	36
S 3209 Standkultur	500	27°	10	151
Schüttelk.	500	27°	10	59

2. Orientierende Untersuchung der Rohextrakte

Von allen Extrakten wurden ca. 50 γ, mit Phomin (7), Gentisinalkohol (3), Phomazarin (1) und Cynodontin (2) als Vergleichssubstanzen,[4] auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Fliessmittel diente ein Gemisch von 10-proz. Methanol in Methylenchlorid.

Die Substanzflecke des Chromatogramms wurden durch Joddampf (vgl. Figur 1) sichtbar gemacht. Dabei ergab sich folgendes:

Keiner der Rohextrakte enthielt einen Fleck, der Phomin (7), Phomazarin (1) oder Cynodontin (2) entsprach. Die Sichtbarkeitsgrenze liegt für Phomin bei 5 µg [4], für Phomazarin und Cynodontin bei noch geringeren Mengen. Da eine relativ grosse Rohextraktmenge aufgetragen worden war (bei noch höheren Konzentrationen entstand Schweifbildung über die ganze Fliesshöhe), durfte die Anwesenheit der oben genannten Vergleichsmetabolite mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden. Bei Stamm S 729 wurde diese Annahme durch Aufarbeitung des Rohextraktes bestätigt.

Das Chromatogramm des Rohextraktes von Stamm S 729 zeigte einen Fleck, dessen Rf-Wert und Färbung Gentisinalkohol (3) entsprach. Ausserdem enthielt es weitere acht scharfe Flecke. Die anderen Extrakte wiesen hingegen bedeutend weniger Einzelsubstanzen auf. Bei der späteren Aufarbeitung zeigte es sich, dass zwei Flecke des Rohextraktes von Stamm S 729 von Zersetzungsprodukten der Metabolite stammten.

In den Rohextrakten der Stämme S 455 und S 3209 wurden in gleicher Höhe Flecke gefunden, die im UV.-Licht dieselbe hellgelbe Fluoreszenz aufwiesen.

---

4) Wir danken an dieser Stelle Herrn Dr. H. P. Sigg, Sandoz A.G., für die Ueberlassung von authentischem Gentisinalkohol, Phomazarin und Cynodontin.

Zur weitern Untersuchung wurde ein analoges Dünnschichtchromatogramm hergestellt, wobei als Fliessmittel ein Gemisch von 15-proz. Methanol in Methylenchlorid und zur Entwicklung $FeCl_3$-Sprühreagens verwendet wurde (vgl. Figur 2).

Sechs Flecke des Rohextraktes von Stamm S 729 ergaben farbige Fe^{III}-Komplexe. Ein Fleck entsprach wiederum in Färbung und Rf-Wert (ca. 0,4, vgl. Literatur: 0,41 [7]) dem Gentisinalkohol (3). Ein weiterer Fleck wies einen Rf-Wert von 0,44 auf (vgl. 0,45 [7]), sodass die Anwesenheit eines andern bekannten Phoma-Metaboliten, von Epoxydon (4), nicht ausgeschlossen werden konnte. Da kein Vergleichsmaterial zur Verfügung stand, konnte erst bei der Aufarbeitung festgestellt werden, dass es sich um eine andere Verbindung handelt.

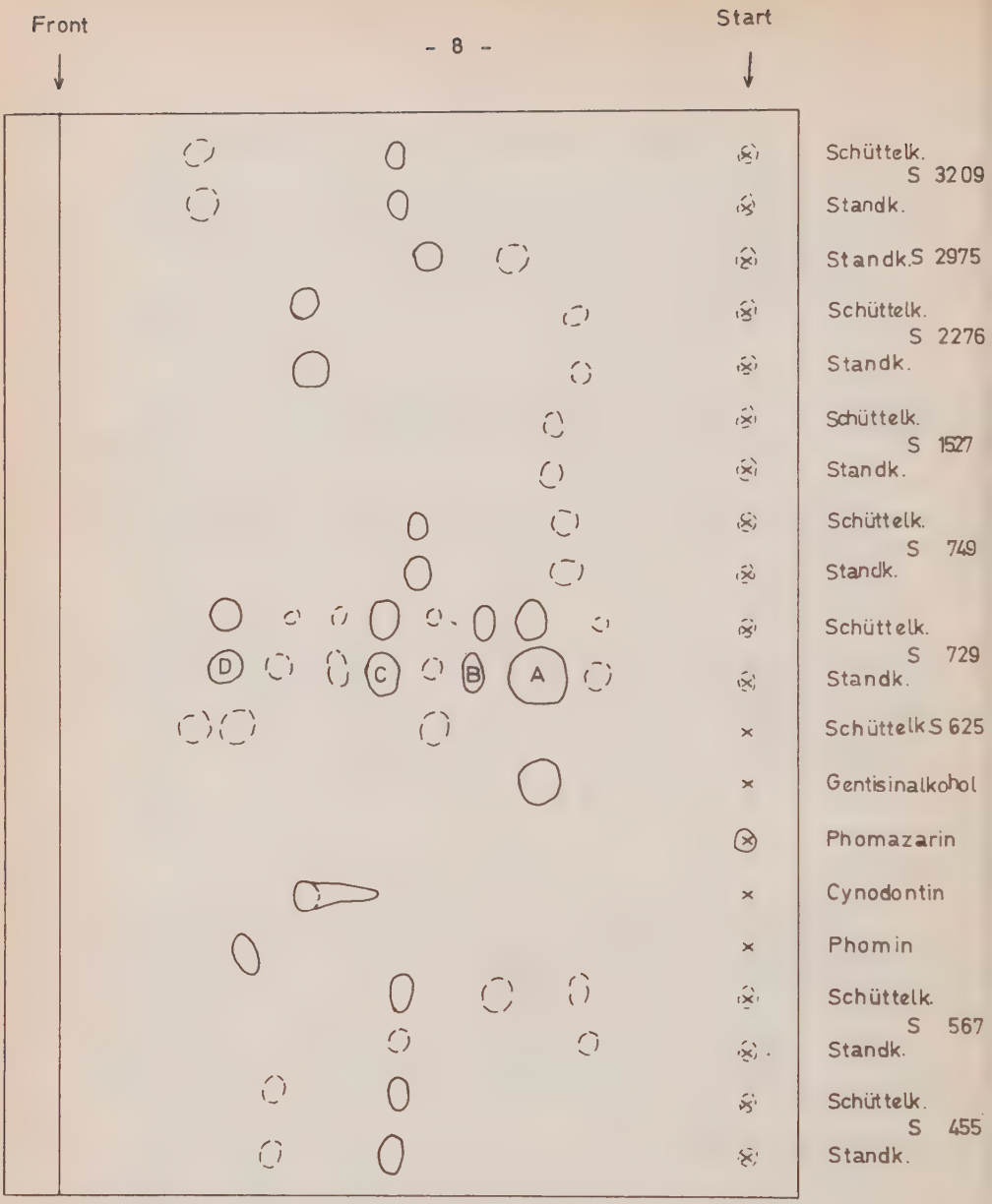
Die im UV.-Licht fluoreszierenden Flecke der Extrakte von Stamm S 455 und S 3209 ergaben mit dem Sprühreagens dieselbe gelbe Färbung. Die Vermutung lag nahe, dass es sich um die gleichen komplexbildenden Metabolite handelte.

Mit einem Gemisch von Methylenchlorid-Methanol-Eisessig-(89:10:1) als Fliessmittel wurden keine anderen Resultate erhalten.

Von den Stämmen S 455, S 729 und S 3209 wurden jeweils 5 Liter Nährlösung beimpft und die Kulturansätze nach genügendem Wachstum mit Essigester extrahiert.

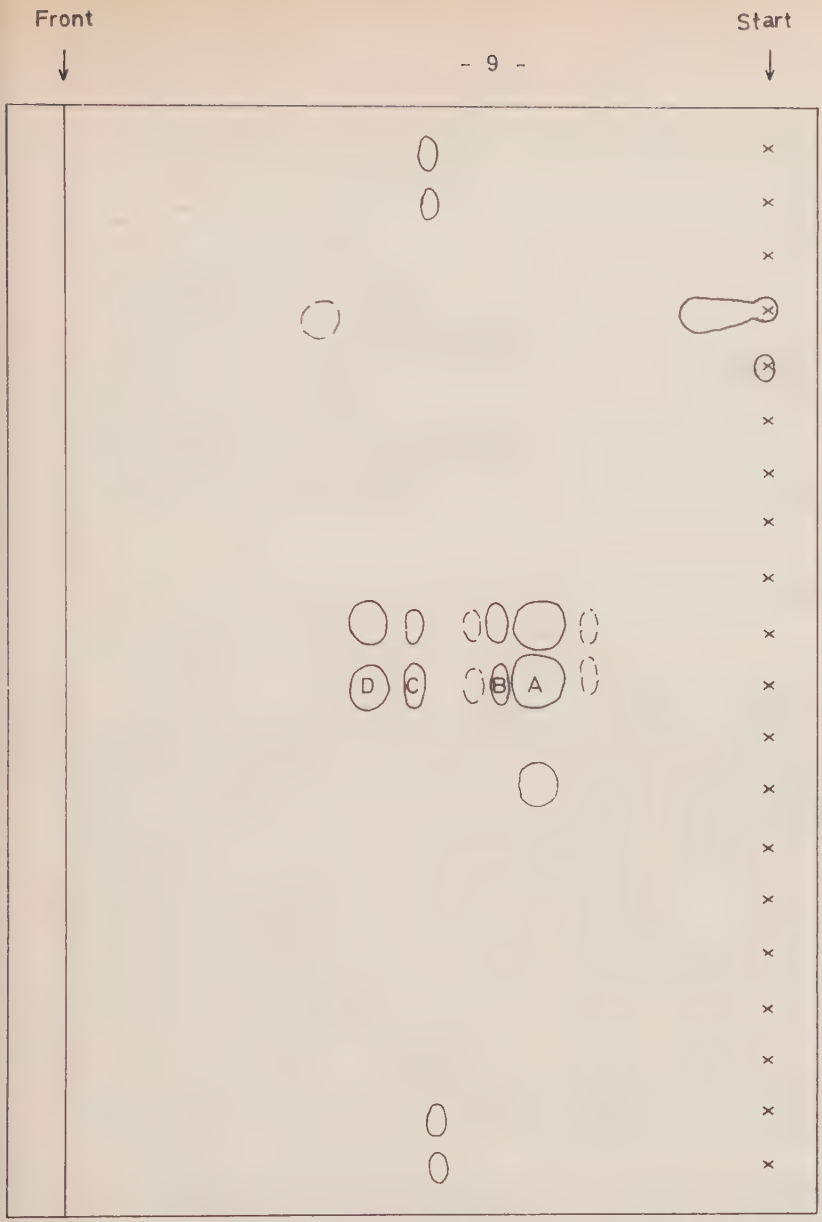
Eine Nachextraktion der Kulturbrühen mit Chloroform-Methanol-(2:1) ergab nur geringe Mengen an Rohextrakt. Diese wiesen im Dünnschichtchromatogramm Flecke auf, die den Essigester-Extrakten entsprachen.

Die Rohextrakte der Stämme S 455 und S 3209 wurden nicht weiter untersucht.



FIGUR 1

A Gentisinalkohol
B Chlorogentisinalkohol
C Toluhydrochinon
D Gentisinacetal



FIGUR 2

A Gentisinalkohol
B Chlorogentisinalkohol
C Toluhydrochinon
D Gentisinacetal

III. Die Metabolite der Phoma spec. Stamm S 729

1. Phoma species Stamm S 729

Der Mikroorganismus Phoma sp. Stamm 729 bildet als Standkultur rot-weiss gefleckte, wellige Myceldecken, als Schüttelkultur tiefrote Knollen. Es wurde beobachtet, dass Kulturen, die weniger dem Licht ausgesetzt waren, eine tiefer rote Myceldecke bildeten als solche, die einen hellen Standort hatten. Die Myceldecken strömten nach Abtrennung der Nährlösung einen frischen Waldbodengeruch aus.

2. Isolierung der Metabolite

Analog zu den oben beschriebenen kleinern Kulturversuchen wurde Stamm S 729 nun in Ansätzen von 5, 10 bzw. 20 Litern Nährlösung als Standkulturen bei 27° gezüchtet und nach 7 - 9 Tagen geerntet. Die Extraktion der Kulturlösungen mit Essigester ergab braune Rohextrakte, zum Teil mit Kristallansätzen.

Wurde das Mycel im Mixer zerkleinert und die gesamte Kulturbrühe extrahiert, so erhöhte sich die Ausbeute der Metabolite. Im Dünnschichtchromatogramm zeigten sich zwei schwache neue Flecke. Meist wurde jedoch auf die Verarbeitung des Mycels verzichtet, da sich bei der Extraktion Emulsionen bildeten und da die Abtrennung der Essigesterphase vom wässerigen, mycelhaltigen Teil Schwierigkeiten bereitete.

Eine Auftrennung des Rohextraktes in basische, saure und neutrale Anteile durch Ausschütteln mit verdünnter Salzsäure bzw. verdünnter Sodalösung war wegen der Empfindlichkeit der Metabolite gegenüber Säuren und Basen nicht möglich.

Der gesamte Rohextrakt wurde an Kieselgel, später - ohne Aenderung der Resultate - an neutralem Al_2O_3 der Aktivitätsstufe I mit Gemischen von Methylenchlorid und Methanol chromatographiert. Nach weiterer Chromatographie einzelner Fraktionen-

gruppen wurden die reinen Metabolite gewonnen.

3. Strukturaufklärung der Metabolite

3.1. Gentisinalkohol (3)

Die Isolierung konzentrierte sich zunächst auf den nach den Dünnschichtchromatogrammen vermuteten Gentisinalkohol (2,5-Dihydroxybenzylalkohol) (3). Der Metabolit kristallisierte aus Äther-Petroläther in hellen, rötlich-braunen Nadeln vom Schmelzpunkt 100,5 - 101°. Er wurde als Hauptmetabolit in einer durchschnittlichen Ausbeute von 300 mg pro Liter Nährlösung gewonnen.

Eine rasch verschwindende Blaufärbung mit alkoholischer $FeCl_3$-Lösung wies auf den phenolischen Charakter der Verbindung hin.

Das IR.-Spektrum in KBr zeigte durch Absorptionen bei 3460, 3300 und 3200 cm^{-1} die zum Teil durch intramolekulare H-Brücken verbundenen HO-Gruppen an. Bei 2950, 2895 und 1470 cm^{-1} wurden die Banden der CH_2-Gruppen gefunden. Die Absorptionen bei 1610 und 1505 cm^{-1} wiesen auf einen aromatischen Ring hin, was durch Banden bei 870 cm^{-1} (ein isoliertes H) bzw. bei 810 cm^{-1} (2 vicinale H-Atome am Benzolring) bestätigt wurde. Weitere Banden lagen bei 1240, 1210, 1180, 1160, 1110, 995 und 960 cm^{-1}.

Das Spektrum war identisch mit demjenigen von authentischem Gentisinalkohol.

Die Tribenzoylderivate von Metabolit und Vergleichssubstanz zeigten nach Dünnschicht und Mischschmelzpunkt Uebereinstimmung.

Gentisinalkohol (3) ist ein relativ häufig auftretender Pilzmetabolit. Ausser in Phoma-Stämmen wurde er auch in verschiedenen Penicillium-Stämmen, erstmals in Penicillium patulum [8] gefunden.

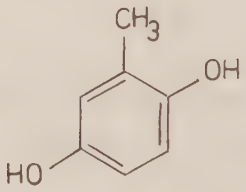
3.2. Toluhydrochinon (9)

Neben dem Gentisinalkohol wurde eine weniger polare Substanz isoliert, die aus Äther-Pentan in weissen Nadeln vom Schmelzpunkt 119 - 121° kristallisierte und sublimierbar war. Die Kristalle verfärbten sich bei längerem Stehen an Licht schwarz-violett.

Eine Rotfärbung mit alkoholischer $FeCl_3$-Lösung liess das Vorliegen eines Phenols vermuten. Die Werte der C,H-Analyse passten auf die Summenformel $C_7H_8O_2$. Das Massenspektrum mit einem Molekular-Ion bei m/e 124 bestätigte diese Annahme.

Das IR.-Spektrum zeigte eine breite Bande bei 3600 - 3100 cm^{-1}. Absorptionen bei 2920, 2850 und 1470 cm^{-1} wiesen auf eine Methylen- oder Methylgruppe hin. Eine starke Bande bei 1380 cm^{-1} sprach für eine Methylgruppe. Die Absorptionen bei 1605 und 1500, ebenso bei 880 (ein isoliertes H-Atom) und 820 cm^{-1} (zwei vicinale H-Atome am Benzolkern) liessen ein 1,2,4-substituiertes Benzolderivat erwarten. Weitere Banden lagen bei 1320, 1200, 1105, 1000, 950, 775 und 730 cm^{-1}.

Im UV.-Spektrum erschienen die Absorptionsmaxima bei 194,5 nm ($\log \varepsilon = 4{,}60$), 216 nm ($\log \varepsilon = 3{,}73$), 225 nm ($\log \varepsilon = 3{,}67$) und 293 nm ($\log \varepsilon = 3{,}53$). Die charakteristischen Maxima für Hydrochinon liegen bei 225 und 293 nm, sodass zusammen mit den obigen Daten auf das Vorhandensein von Toluhydrochinon (9) geschlossen werden konnte. Diese Annahme erwies sich als zutreffend.



9

Die Identität des Metaboliten mit Toluhydrochinon wurde durch Vergleich mit einem synthetischen Präparat im Dünnschichtchromatogramm, in den IR.- und UV.-Spektren und durch den Mischschmelzpunkt bewiesen. Auch das Dibenzoat war nach Dünnschichtchromatogramm, Mischschmelzpunkt und IR.-Spektrum mit einer authentischen Probe identisch.

Toluhydrochinon ist schon früher als Stoffwechselprodukt eines Stammes von Penicillium patulum, ebenfalls neben Gentisinalkohol (3), gefunden worden [9]. Auf die biogenetischen Zusammenhänge wird in einem späteren Kapitel eingegangen.

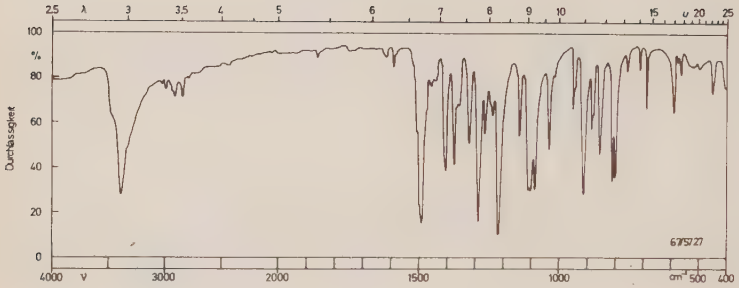
3.3. Gentisinacetal (10)

3.3.1. Eigenschaften und Struktur des Metaboliten

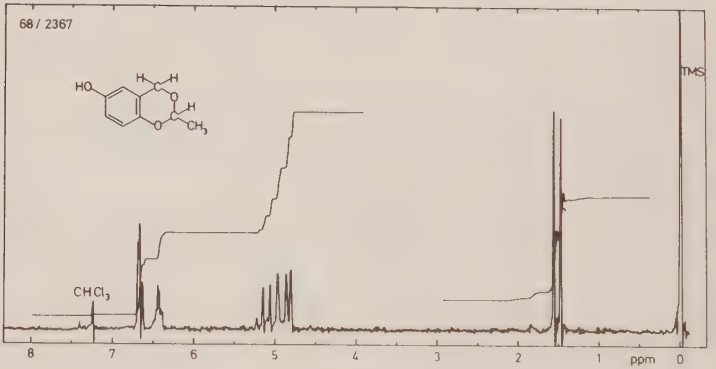
Aus einem Ansatz von 20 Litern Kulturlösung wurde eine Substanz erhalten, die aus Methylenchlorid-Cyclohexan in farblosen, zuweilen schwach rötlichen Nadeln vom Schmelzpunkt 103 - 105° kristallisierte. Von allen isolierten Stoffen zeigte sie die geringste Polarität. Mit alkoholischer $FeCl_3$-Lösung gab sie eine Blaufärbung, die auf eine phenolische HO-Gruppe hinwies.

Die Elementaranalyse ergab die Summenformel $C_9H_{10}O_3$. Sie wurde durch das Massenspektrum (vgl. Formelschema 2) mit einem Molekular-Ion bei m/e 166 bestätigt.

Das IR.-Spektrum (vgl. Figur 3) zeigte eine breite Hydroxylbande bei 3500 - 3200 cm^{-1}. Die Absorptionen bei 2990, 2910 und 2850 cm^{-1} stammen von Methylen- bzw. Methylgruppen. Letztere wurden durch die Bande bei 1370 cm^{-1} (symmetrische C-H-Beugeschwingung) bestätigt. Die Banden bei 1610, 1585 und 1490 cm^{-1} sowie bei 900 - 800 cm^{-1} wiesen auf einen aromatischen Ring hin. Die relativ starken Absorptionen bei 900 und 800 cm^{-1} liessen auch hier eine 1,2,4-Substitution vermuten. Ausserordentlich bandenreich war die Fingerprintregion. Starke Absorptionen bei 1315, 1105, 1100 und 1080 cm^{-1} deuteten auf die Möglichkeit einer Acetalstruktur. Die Schwingungen bei 1280, 1210 und 1030 cm^{-1} sprachen für einen Aryläther.

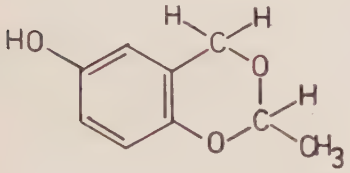


Figur 3: IR.-Spektrum von Gentisinacetal (10) fest in KBr

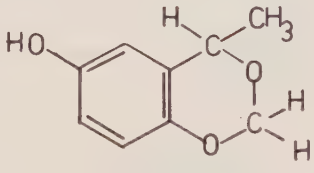


Figur 4: 60 MHz-NMR.-Spektrum von Gentisinacetal (10) in $CDCl_3$

Das 60 MHz-NMR.-Spektrum in $CDCl_3$ (vgl. Figur 4) zeigte bei δ = 1,52 ppm ein Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 5 Hz, das drei Protonen entsprach. Mit der gleichen Kopplungskonstanten erschien bei $\delta \simeq 5{,}1$ ppm ein Proton als Quartett. Ein Singulett bei δ = 4,95 ppm, entsprechend einem Proton, verschwand beim Deuterieren. Mit diesen Daten waren eine Hydroxylgruppe und das Strukturelement $CHCH_3$ gesichert. Drei aromatische Protonen erschienen bei δ = 6,42 und 6,65 ppm. Nach diesen Daten kommen für den Metaboliten die Strukturformeln I und II in Frage:

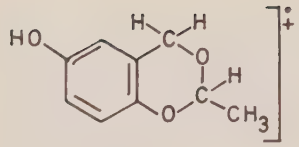


I



II

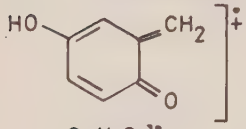
Die beiden geminalen Methylenprotonen traten als AB-System mit den zentralen Signalen bei δ = 4,80 und 4,85 ppm auf (wahre chemische Verschiebungen bei δ = 4,74 und 4,91 ppm). Das Intensitätsverhältnis der inneren zu den äusseren Signalen betrug II:1. Die relativ grosse Kopplungskonstante von 15 Hz setzt sich aus folgenden Werten zusammen: Die Kopplungskonstante für geminale Methylenprotonen neben Sauerstoff in cyclischen Sechsring-Äthern beträgt (-10) bis (-14) Hz [10]. Für Methylenprotonen neben einem π-System, in unserm Fall dem Benzolring, gilt bei einem Winkel von ca. 45° zwischen den Protonen und dem π-Orbital (dieser Winkel ist aus dem Modell ersichtlich) zusätzlich ein Inkrement von (-4,5) Hz. Die beobachtete Kopplungskonstante von 15 Hz spricht also deutlich für Struktur I. Vergleichsweise ergeben geminale Methylenprotonen in einer Methylendioxy-Gruppierung im Sechsring eine



$C_9H_{10}O_3$
m/e 166
(21,4 %)

$\xrightarrow{-HCO^{\bullet}}$ $C_8H_9O_2]^+$
m/e 137
(1,0 %)

$\downarrow$ $-CH_3CHO$ (m* 89,7)



$C_7H_6O_2]^{\cdot+}$
m/e 122
(100 %)

$\downarrow$ $-CO$ (m* 72,4)

$C_6H_6O]^{\cdot+}$
m/e 94
(54,3 %)

$\downarrow$ $-CO$ (m* 46,5)

$C_5H_6]^{\cdot+}$
m/e 66
(13,6 %)

FORMELSCHEMA 2

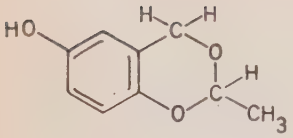
Kopplungskonstante von (-5) bis (-7) Hz. Struktur II ist somit wenig wahrscheinlich, sind doch bei ihr keine Inkremente wegen benachbarter π -Systeme zu berücksichtigen.

Im Massenspektrum (vgl. Formelschema 2) erschien das Molekular-Ion (m/e 166) mit einer relativen Intensität von 21,4 %. Abspaltung von Acetaldehyd ergab den "base peak" bei m/e 122. Dieser Zerfall wurde durch ein Uebergangssignal bei m/e 89,7 bestätigt. Durch zweimalige Abspaltung von CO entstanden die Signale bei m/e 94 (relative Intensität: 54,3 %, m*/e 72,4) und bei m/e 66 (relative Intensität: 13,6 %, m*/e 46,5). Durch Abspaltung von HCO aus dem Molekularion wurde das Signal bei m/e 137 (relative Intensität: 1,0 %) gebildet.

Auch diese Ergebnisse sprechen für die Strukturformel I. Damit im Einklang ist das Resultat der hydrolytischen Spaltung mit Säure (vgl. Formelschema 3).

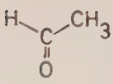
Nach kurzem Erwärmen des Metaboliten mit verdünnter Salzsäure zeigte das Rohprodukt im Dünnschichtchromatogramm einen Fleck, der dem erwarteten Gentisinalkohol (3) entsprach. Wurden die Reaktionsprodukte in eine Dimedonlösung destilliert, so konnte im Dünnschichtchromatogramm Acetaldimedon (11) nachgewiesen werden. Aus dem Dimedonderivat wurde durch kurzes Erwärmen mit verdünnter Salzsäure direkt das Acetaldimedonanhydrid (12) hergestellt, welches nach Dünnschichtchromatogramm mit einem authentischen Präparat identisch war und im Massenspektrum das Molekularion bei m/e 288 aufwies. Damit ist die Acetalstruktur 10 für den Pilzmetaboliten bewiesen. Wir nennen ihn Gentisinacetal.

Die Verbindung 10 lässt eine optische Aktivität erwarten, denn sie besitzt in der Gruppierung $-O-\overset{*}{C}HCH_3-O-$ ein chirales C-Atom. Auch nach sehr sorgfältigem und raschem Aufarbeiten des Rohextraktes (Chromatographie an neutralem Al_2O_3 statt an Kieselgel, nur leichtes Erwärmen beim Abdampfen der Lösungsmittel) wurde stets inaktives Material erhalten. Da erst ein

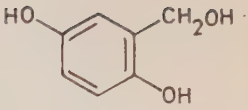


10

verd. HCl

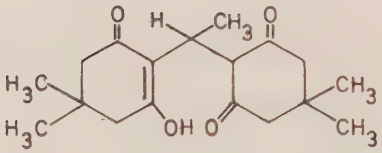


+



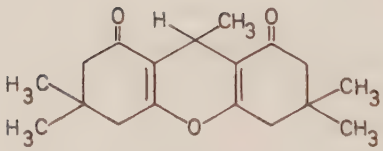
3

Dimedon



11

verd. HCl



12

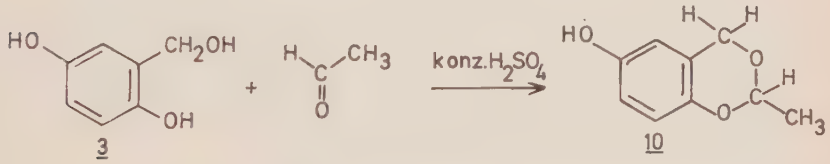
FORMELSCHEMA 3

Erwärmen mit verdünnter Säure eine Spaltung von 10 ergibt, dürfte auch eine Racemisierung durch Lösungsmittel, die durch Zersetzung Spuren von Säuren bilden könnten (z. B. Methylenchlorid) ausgeschlossen sein.

3.3.2. Synthese

Einen weitern Strukturbeweis erbrachte die Synthese von Gentisinacetal (10) (vgl. Formelschema 4).

Für die Synthese von Acetalen bestehen grundsätzlich die folgenden Methoden: Man lässt den entsprechenden Alkohol mit dem passenden Aldehyd reagieren, wobei als Katalysator konz. H_2SO_4 [11], HCl, p-Toluolsulfonsäure oder $CaCl_2$ [12] zugegeben werden. Die Reaktion stellt ein Gleichgewicht dar. Die für 10 gewählte Methode mit konz. H_2SO_4 als Katalysator kommt der Umkehr der hydrolytischen Spaltung (s. oben) gleich.



FORMELSCHEMA 4

Gentisinalkohol (3), der nach dreimaligem Umkristallisieren aus Äther-Petroläther einen Schmelzpunkt von 101° aufwies, wurde in frisch destilliertem Acetaldehyd gelöst, mit 2 Tropfen konzentrierter H_2SO_4 versetzt und unter Feuchtigkeitsausschluss während drei Stunden bei 0° belassen. Nach der Aufarbeitung resultierte ein gelbes Oel, welches nach Chromatographie an Kieselgel und Umkristallisieren aus Methylenchlorid-Cyclohexan farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 103 - 105° ergab. Das synthetische Produkt war mit dem Metaboliten nach Mischschmelzpunkt, Dünnschichtchromatogramm, IR.- und NMR.-Spektrum identisch.

Spaltung des synthetischen Präparats mit verdünnter Salzsäure lieferte, wie oben beschrieben, Acetaldimedon (11), das

durch Kochen mit Säure in das Acetaldimedonanhydrid (12) vom Schmelzpunkt 136 - 138° überging.

3.3.3. Diskussion

Gentisinacetal (10) ist eine neue Verbindung. Es sind nur wenige Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen bekannt, die eine Acetalstruktur aufweisen. Fünfring-Acetale finden wir in den Strukturen von Roridin H aus Myrothecium roridum und Myrothecium verrucaria [13] und von 2-(6-Hydroxy-2-methoxy-3,4--methylen-dioxyphenyl)-benzofuran, einer aus Hefe isolierten Verbindung [14]. Als einziges Beispiel für einen Metaboliten, der eine Sechsring-Acetal-Gruppierung enthält, ist das Antibioticum Streptolydigin [15] [16] aus Streptomyces lydigus bekannt (vgl.Formelschema 5).

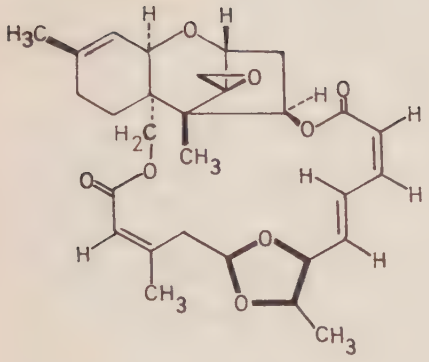
Die Vermutung liegt nahe, dass das Strukturelement $-CHCH_3-$ im Acetalring von 10 biogenetisch von Acetat abgeleitet ist. Da der benutzte Stamm des Mikroorganismus nach einigen Generationen die Bildung des Metaboliten einstellte, konnten jedoch keine Untersuchungen zur Abklärung der Biosynthese des Gentisinacetals (10) durchgeführt werden.

3.4. Chlorogentisinalkohol (13)

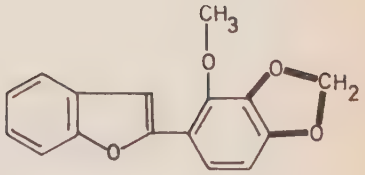
3.4.1. Eigenschaften und Struktur des Metaboliten

Ein weiterer Metabolit aus Phoma Stamm S 729 kristallisierte aus Äther-Cyclohexan in schwach rötlichen Nadeln vom Schmelzpunkt 140 - 141,5°. Bei starker Lichteinwirkung verfärbten sich die Kristalle grau-schwarz. Alkoholische $FeCl_3$-Lösung erzeugte eine rasch verschwindende Blaufärbung, sodass wiederum das Vorliegen eines Phenols, eventuell mit Hydrochinon-Struktur, zu vermuten war.

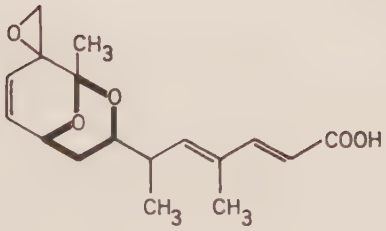
Die Elementaranalyse ergab einen auffallend tiefen C-Wert (48,15 %). Aufschluss über die Bruttoformel vermittelte das



Roridin H



2-(6-Hydroxy-2-methoxy-3,4-methylendioxyphenyl)-benzofuran



Produkt der Perjodat-Oxidation des Natrium-Salzes von Streptolydigin

FORMELSCHEMA 5

Massenspektrum. Neben dem Molekular-Ion bei m/e 174 erschien ein Isotopensignal bei m/e 176 (M^++2) mit ca. einem Drittel der Intensität des Molekular-Ions. Dieser Befund wies auf ein Chloratom in der Molekel hin. Entsprechend fiel der Beilstein-Test positiv aus. Die Werte der C,H- und Cl-Bestimmungen stimmten auf die Summenformel $C_7H_7O_3Cl$.

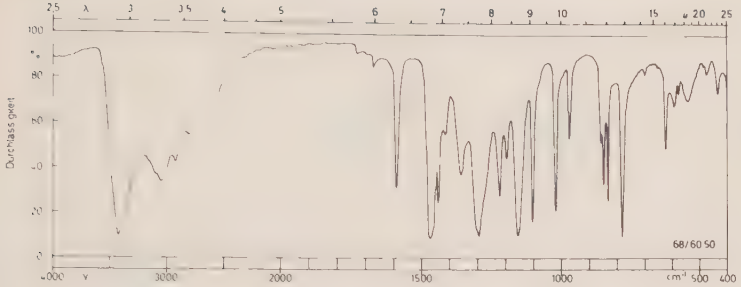
Im IR.-Spektrum (vgl.Figur 5) erschienen Banden bei 3600 - 3200 und 3200 - 2980 cm^{-1} (Hydroxylgruppen). Absorptionen bei 2940 und 1450 cm^{-1} sprachen für eine Methylengruppe, diejenigen bei 1600 und 1480, sowie die Bandengruppe zwischen 900 und 800 cm^{-1} für ein Benzolderivat. Eine sehr starke Absorption bei 790 cm^{-1} wurde dem Chlor zugeordnet. Weitere Banden lagen bei 1305, 1230, 1165, 1115, 1030 und 980 cm^{-1}.

Das 60 MHz-NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2CO$ wies bei δ = 4,55 - 4,78 ppm ein unten verbreitertes Singulett auf, welches drei Protonen entsprach. Nach Deuterieren entstand ein scharfes Singulett bei δ = 4,70 ppm (2H). Ein Singulett bei δ = 6,78 ppm wurde zwei aromatischen Protonen zugeordnet. Zwei weitere Signale erschienen bei δ = 7,83 und 8,12 ppm und verschwanden nach dem Deuterieren.

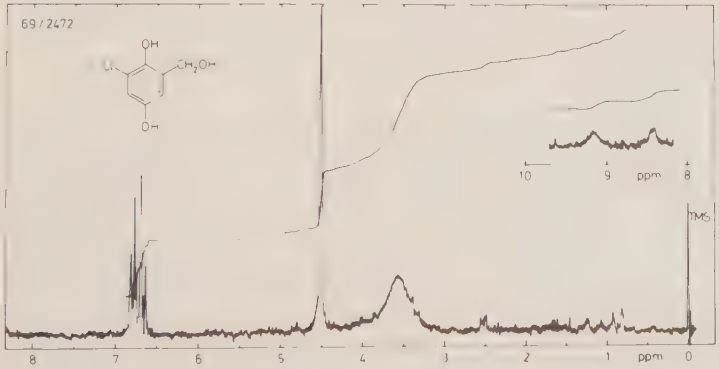
Wurde das gleiche Spektrum in $(CD_3)_2SO$ (vgl.Figur 6) aufgenommen, so traten die aromatischen Protonen als AB-System mit den Zentren bei δ = 6,67 und 6,81 ppm auf. Die Kopplungskonstante von 3 Hz sprach für die meta-Stellung der Protonen. Das Signal bei δ = 4,52 ppm wurde einer Methylengruppe zugeordnet. Die drei austauschbaren Protonen (Hydroxylgruppen) erschienen verbreitert bei $\delta \simeq$ 3,60, 8,32 und 9,17 ppm.

Es lag nahe, auch für diesen Metaboliten eine mit Gentisinalkohol (3) verwandte Struktur anzunehmen. Nach den obigen Daten ist die Strukturformel 13 sehr wahrscheinlich. Die Stellung der Substituenten ist allerdings noch nicht gesichert.

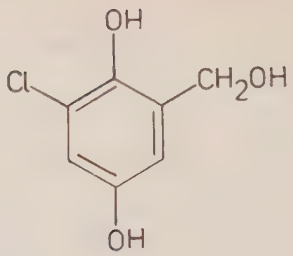
Im Massenspektrum (vgl. Formelschema 6) tritt das Molekular-Ion (m/e 174/176) mit einer relativen Intensität von 22,3 %



Figur 5: Ir.-Spektrum von Chlorogentisinalkohol 13 (2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzylalkohol) fest in KBr



Figur 6: 60-MHz-NMR.-Spektrum von Chlorogentisinalkohol 13 (2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzylalkohol) in $(CD_3)_2SO$



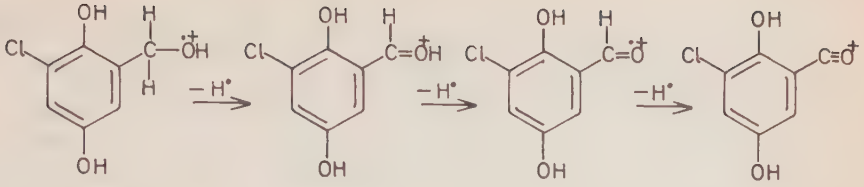
13

auf. Durch dreimalige Abspaltung eines Wasserstoffradikals entstehen die Signale bei m/e 173/175 (relative Intensität: 0,83 %), m/e 172/174 (relative Intensität: 0,84 %) und m/e 171/173 (relative Intensität: 1,7 %). Abspaltung von H_2O ergibt den "base peak" bei m/e 156/158 (m*/e 139,9). Das Fragment spaltet zweimal CO ab und bildet die Signale bei m/e 128/130 (relative Intensität: 36,8 %, m*/e 78,5) und bei m/e 100/102 (relative Intensität: 6,6 %). Das Signal bei m/e 65 (relative Intensität: 28,1 %, m*/e 42,3 %) entsteht durch Abspaltung eines Chlorradikals.

3.4.2. Synthese der drei isomeren Chlorogentisinalkohole (13, 17, 18)

Die physikalischen Daten erlauben keine eindeutige Entscheidung über die Stellung der Substituenten in der postulierten Struktur des Metaboliten. Nur der direkte Vergleich mit allen drei isomeren Chlorderivaten des Gentisinalkohols kann diesen herbeiführen. Im folgenden wird die Synthese dieser drei noch unbekannten Verbindungen beschrieben.

In der Literatur ist die Herstellung von Gentisinalkohol ausgehend von Hydrochinon nach der Reimer-Tiemann-Synthese angegeben [17]. Es lag deshalb nahe, in analoger Weise aus Chlorhydrochinon den Chlorgentisinaldehyd herzustellen und diesen



$C_7H_7O_3Cl$
m/e 174/176
(22,3 %)

m/e 173/175
(0,83 %)

m/e 172/174
(0,84 %)

m/e 171/173
(1,7 %)

$-OH^{\bullet}$ (m*/e 141,7)

$C_7H_6O_2Cl]^+$
m/e 157/159
(14,9 %)

$-H^{\bullet}$

$-H_2O$ (m*/e 139,9)

$C_7H_5O_2Cl]^{\ddagger}$
m/e 156/158
(100 %)

$-HCl$

$-Cl^{\bullet}$

$C_7H_5O_2]^+$
m/e 121
(6,6 %)

$-CO$ (m*/e 78,5)

$C_6H_5OCl]^{\ddagger}$
m/e 128/130
(38,8 %)

$-CO$

$C_5H_5Cl]^{\ddagger}$
m/e 100/102
(6,6 %)

$-Cl^{\bullet}$ (m*/e 42,3)

$C_5H_5]^+$
m/e 65
(28,1 %)

FORMELSCHEMA 6

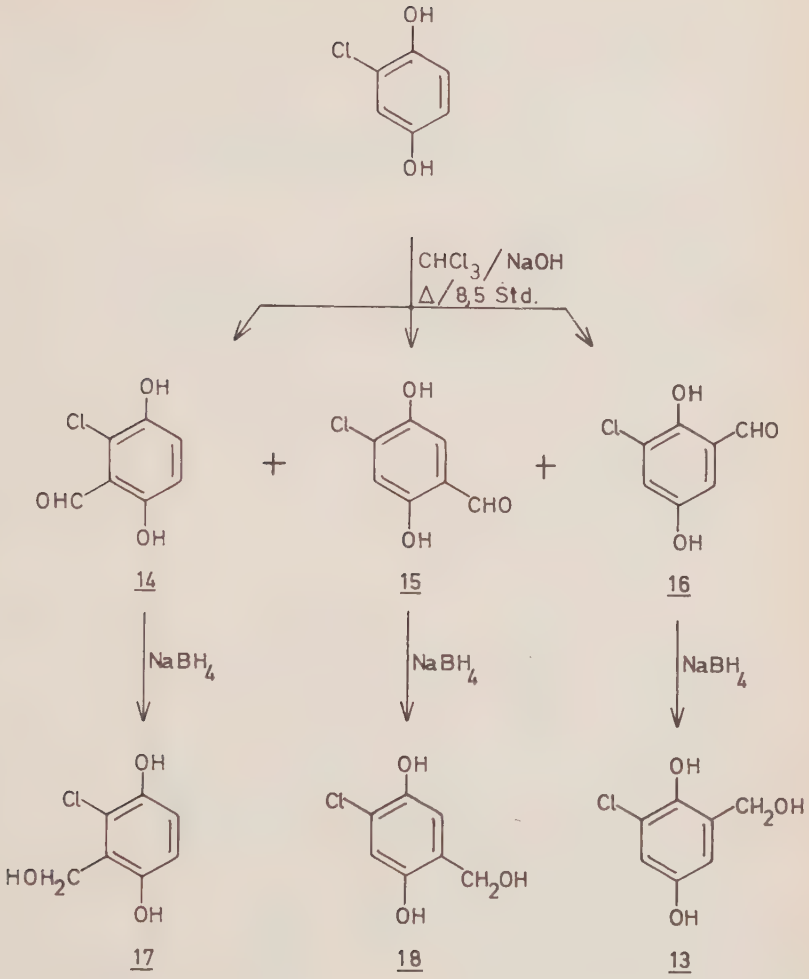
zum Chlorogentisinalkohol zu reduzieren. Allerdings ist bekannt, dass die Einführung der Aldehydgruppe nach Reimer-Tiemann bei alkylierten Hydrochinonderivaten äusserst schlecht verläuft [18]. Es wurde deshalb zuerst die Aldehydsynthese nach Gattermann-Adams mit $Zn(CN)_2$ und HCl bzw. mit $Zn(CN)_2$, $AlCl_3$ und HCl [12]und nach Vilsmeier mit N-Methylformanilid und $POCl_3$ [13] versucht. Die Resultate waren negativ, vermutlich weil bei diesen Synthesen ein zur Hydroxylgruppe para-ständiger Angriff bevorzugt wird.

Hingegen führte die Umsetzung von Chlorhydrochinon nach der Methode von Reimer-Tiemann [12] (vgl. Formelschema 7) mit Chloroform und NaOH zum Erfolg, wenn im N_2-Strom und unter Lichtausschluss gearbeitet wurde. Die Reaktionszeit betrug 8,5 Stunden. Aus dem Rohprodukt liessen sich nach Chromatographie an Kieselgel die drei isomeren Aldehyde 14, 15 und 16 in einer Gesamtausbeute von 5 % gewinnen.

Als Hauptprodukt (Ausbeute: 2,5 %) wurde der Chlorgentisinaldehyd 14 (2,5-Dihydroxy-6-chlor-benzaldehyd) aus Methylenchlorid in orange-gelben Nadeln vom Schmelzpunkt 144 - 147° erhalten. Im Dünnschichtchromatogramm wurde der Substanzfleck mit Joddampf braunrot angefärbt.

In etwas geringerer Menge (1,4 %) fiel der Chlorgentisinaldehyd 15 (2,5-Dihydroxy-4-chlor-benzaldehyd) an. Aus Methylenchlorid kristallisierte er in hellgelben Oktaedern vom Schmelzpunkt 172 - 174°. Das Dünnschichtchromatogramm wies nach Entwickeln in Joddampf einen graubraunen Fleck auf.

Der Chlorgentisinaldehyd 16 (2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzaldehyd) (0,8 %) wurde in hellgelben Kristallen vom Schmelzpunkt 120 - 129° gewonnen. Wie im Dünnschichtchromatogramm ersichtlich war, enthielt die Substanz noch 1-Chlor-2-Hydroxybenzaldehyd, welcher von einer Verunreinigung des Chlorhydrochinons stammte. Da die beiden Verbindungen äusserst schwer voneinander zu trennen waren, wurde die endgültige Reinigung erst nach der Reduktion vorgenommen.



FORMELSCHEMA 7

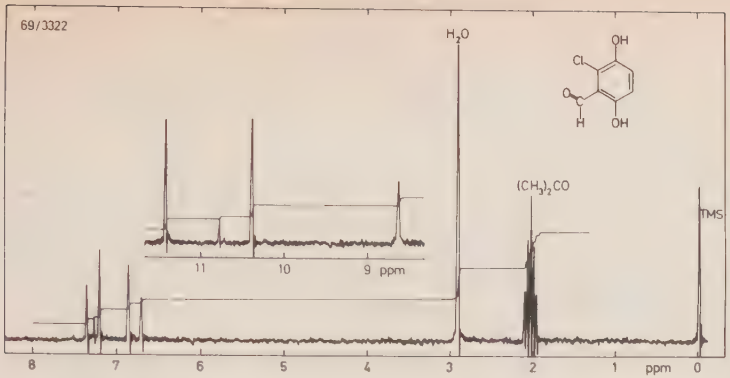
Die Massenspektren der drei Aldehyde (vgl. Formelschema 8) waren identisch und enthielten alle das Molekular-Ion m/e 172 und das auf Chlor hinweisende Isotopensignal bei m/e 174. Das Massenspektrum von 16 enthielt als Nebensignal das Molekular-Ion von 1-Chlor-2-Hydroxybenzaldehyd bei m/e 156 (Isotopensignal bei m/e 158).

Die IR.-Spektren in KBr zeigten neben den Banden bei 3500 - 2900 cm^{-1} (Hydroxyl) und den aromatischen Absorptionen eine starke Carbonylbande bei 1635 (2,5-Dihydroxy-6-chlor-benzaldehyd (14)), 1645 (2,5-Dihydroxy-4-chlor-benzaldehyd (15)) bzw. 1655 cm^{-1} (2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzaldehyd (16)). Die relativ tiefe Lage der Banden ist charakteristisch für Arylaldehyde, die in ortho-Stellung zu einer HO-Gruppe stehen und zu dieser eine intramolekulare Wasserstoffbrücke ausbilden [10]. Die Spektren der drei Verbindungen unterschieden sich voneinander deutlich in der Fingerprint-Region.

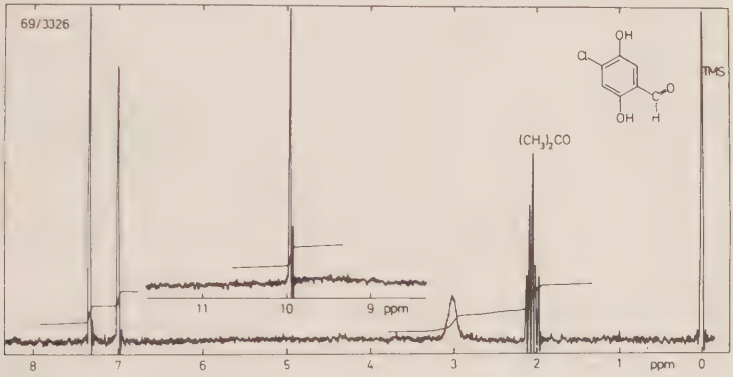
Ueber die Stellung der Substituenten am Benzolkern gaben die NMR.-Spektren (60 MHz, in $(CD_3)_2CO$) Aufschluss (vgl. Figuren 7 - 9).

Die beiden aromatischen Protonen des Aldehyds 14 traten als AB-System bei δ = 6,80 bzw. 7,25 ppm mit einer Kopplungskonstanten von 9 Hz auf, was für die ortho-Stellung der Protonen spricht (Kopplungskonstanten für ortho-Protonen: 6 - 10 Hz [10]). Die Signale bei δ = 8,80 und 11,42 ppm verschwanden beim Deuterieren, entsprachen also den beiden Hydroxylgruppen. Das Proton der Aldehyd-Gruppe wurde bei δ = 10,38 ppm gefunden; das Erscheinen bei so tiefem Feld dürfte durch die zusätzliche Nachbarschaft von Chlor zu erklären sein (Hydroxyl ist in allen drei Verbindungen der Aldehydgruppe benachbart).

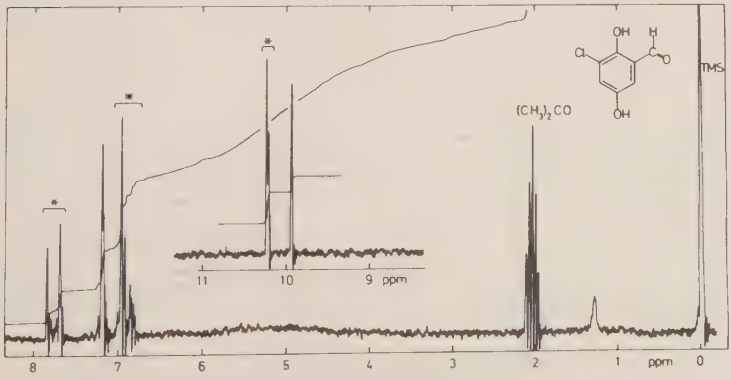
Im NMR.-Spektrum des Aldehyds 15 traten die aromatischen Protonen als zwei scharfe Singulette bei δ = 6,99 und 7,33 ppm auf, was auf die para-Stellung der Protonen deutet. Das Aldehyd-Proton erschien bei δ = 9,92 ppm. Das eine Hydroxyl-Proton



Figur 7: 100 MHz-NMR.-Spektrum von 2,5-Dihydroxy-6-chlor-benzaldehyd (14) in $(CH_3)_2CO$



Figur 8: 100 MHz-NMR.-Spektrum von 2,5-Dihydroxy-4-chlor-benzaldehyd (15) in $(CH_3)_2CO$



Figur 9: 100 MHz-NMR.-Spektrum von 2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzaldehyd (16) in $(CH_3)_2CO$

*) Signale von 1-Chlor-2-Hydroxy-benzaldehyd

wurde bei δ = 3,00 ppm gefunden, das andere stark verbreitert bei δ=8,2 bis 9,7 ppm.

Die aromatischen Protonen des Aldehyds 16 traten als Singulett bei δ = 7,18 ppm auf, die beiden Hydroxyl-Protonen als stark verbreitertes Signal bei δ=4,0 - 6,0 ppm. Das Aldehyd-Proton wurde bei δ = 9,92 ppm gefunden.

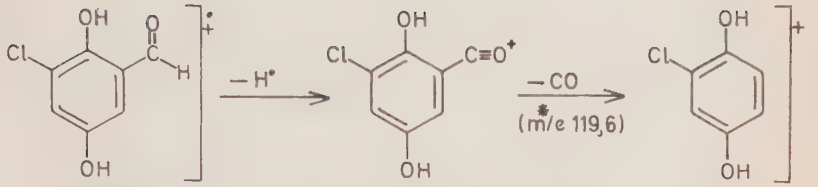
Im Vergleich mit den NMR.-Spektren von 14 und 15 geht eindeutig hervor, dass den aromatischen Protonen von Verbindung 16 meta-Stellung zuzuordnen ist.

Im Massenspektrum (vgl. Formelschema 8) bildet das Molekular-Ion bei m/e 172/174 den "base peak". Nach Abspaltung eines Wasserstoffradikals wird das Signal bei m/e 171/173 (relative Intensität: 76,0 %) gebildet. Nach Abgabe von CO entsteht das Signal bei m/e 143/145 (relative Intensität: 4,0 %, m*/e 119,6). Diese Zerfallssequenz ist charakteristisch für Aldehyde. Durch Abspaltung von H_2O aus dem Molekular-Ion ergibt sich das Ion bei m/e 154/156 (relative Intensität: 13,3 %). Weitere Fragmente entstehen durch CO-Abspaltung aus dem Molekular-Ion bei m/e 144/146 (relative Intensität: 8,0 %), durch HCO-Abgabe bei m/e 115/117 (relative Intensität: 5,3 %) und wiederum durch CO-Abspaltung bei m/e 87/89 (relative Intensität: 9,3 %). Aus dem letzten Fragment entstehen durch Abgabe von HCl die Signale bei m/e 51 (relative Intensität: 30,6 %) und bei m/e 53 (relative Intensität: 32,0 %).

Die Chlorgentisinaldehyde 14, 15 und 16 wurden sodann mit $NaBH_4$ in Dioxan-Wasser-(4:1) reduziert (vgl. Formelschema 7). In je ca. 50-proz. Ausbeute resultierten die Chlorogentisinalkohole 13, 17 und 18.

In den Massenspektren aller drei Isomeren trat das Molekular-Ion bei m/e 174 auf, mit dem Isotopensignal bei m/e 176. Die Spektren waren beinahe identisch.

Im IR.-Spektrum (KBr) der Verbindung 17 (2,5-Dihydroxy-6-chlor-benzylalkohol) vom Smp. 128 - 129° war keine Carbo-



$C_7H_5O_3Cl$
m/e 172/174
(100 %)

m/e 171/173
(76,0%)

m/e 143/145
(4,0%)

$-CO$

$-Cl^{\bullet}$

$-H_2O$

$C_6H_5O_2Cl]^{\ddagger}$
m/e 144/146
(8,0 %)

$C_7H_5O_3]^{+}$
m/e 137
(2,7 %)

$C_7H_3O_2Cl]^{\ddagger}$
m/e 154/156
(13,3 %)

$-HCO$

$C_5H_4OCl]^{+}$
m/e 115/117
(5,3 %)

$C_6H_3OCl]^{\ddagger}$
m e 126/128
(24,0 %)

$-CO$

$C_4H_4Cl]^{+}$
m/e 87/89
(9,3 %)

$-HCl$

$C_4H_3]^{+}$
m/e 51/53
(30,6%/32,0%)

FORMELSCHEMA 8

nylbande mehr vorhanden. Das 100 MHz-NMR.-Spektrum in $(CD_3)_2CO$ (vgl. Figur 10) zeigte bei δ= 4,96 ppm ein Zwei-Protonen-Singulett, welches den Methylenprotonen zugeordnet wurde. Die beiden aromatischen Protonen erschienen als AB-System mit der Kopplungskonstanten 9 Hz bei δ= 6,64 bzw. 6,82 ppm. Die Hydroxylgruppen lagen bei $\delta\sim$3 ppm, bzw. stark verbreitert bei δ = 7-9 ppm.

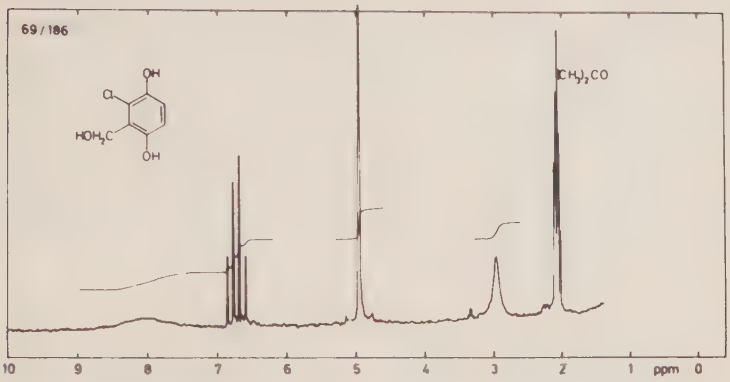
Das IR.-Spektrum des Isomeren 18 (2,5-Dihydroxy-4-chlor--benzylalkohol) vom Smp. 135° war mit demjenigen von 17 vergleichbar, jedoch nicht identisch. Im 100 MHz-NMR.- Spektrum (vgl. Figur 11) traten die Methylenprotonen bei δ= 4,63 ppm auf, die aromatischen Protonen als zwei scharfe Singuletts bei δ= 6,79 bzw. 6,98 ppm. Die drei Hydroxylgruppen erschienen stark verbreitert bei $\delta\sim$2,6 - 3,3 ppm.

Der dritte isomere Alkohol endlich (2,5-Dihydroxy-3-chlor--benzylalkohol) war nach Dünnschichtchromatogramm, Mischschmelzpunkt, Massen-, IR.- und NMR.-Spektrum identisch mit dem isolierten Metaboliten. Somit können wir diesem die Struktur 13 zuweisen.

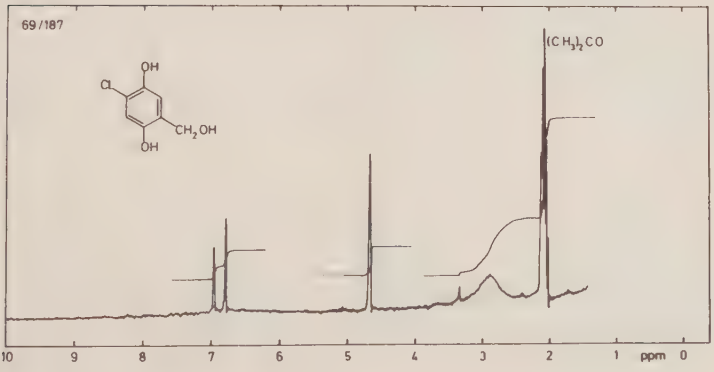
3.4.3. Diskussion

Chlorogentisinalkohol (13) ist ein weiteres Beispiel für ein mikrobielles Stoffwechselprodukt, das kovalent gebundenes Chlor enthält.

Wie das aus Kulturen von Penicillium-Stämmen isolierte Antibioticum Griseofulvin [20] oder die von Aspergillus terreus produzierten Metabolite Erdin und Geodin [21] oder die aus Streptomyces-Arten stammenden Antibiotica Chloramphenicol [22] und Aureomycin [23] zeigen, ist der Mikroorganismus befähigt, ionogenes Chlor der Nährlösung [5] in kovalent gebundenes Chlor umzuwandeln. In den meisten Fällen werden neben den halogenierten Metaboliten auch die entsprechenden halogenfreien Verbindungen isoliert. Ueber den Mechanismus der biologischen Chlo-



Figur 10: 100 MHz-NMR.-Spektrum von 2,5-Dihydroxy-6-chlor-benzylalkohol (17) in $(CH_3)_2CO$



Figur 11: 100 MHz-NMR.-Spektrum von 2,5-Dihydroxy-4-chlor-benzylalkohol (18) in $(CH_3)_2CO$

rierungsreaktion am aromatischen Ringsystem ist nichts bekannt. Hingegen ergaben Studien über den Chlorierungsmechanismus von Caldariomycin (2,2-Dichlor-1,3-Cyclopentandiol) aus Caldariomyces fumago, dass eine Chlorperoxydase, ein Glykoprotein mit Fe^{3+}-Protoporphyrin als prosthetischer Gruppe, unter Einwirkung von H_2O_2 als Oxydationsmittel synthetisches 1,3-Cyclopentandion und 2-Chlor-1,3-Cyclopentandion in 2,2-Dichlor-1,3-Cyclopentandion, eine biogenetische Vorstufe von Caldariomycin, umwandeln kann [24].

4. Zur Biosynthese der isolierten Stoffwechselprodukte

Zur Gewinnung einer optimalen Ausbeute der Metaboliten und zur Ermittlung eventueller biogenetischer Zusammenhänge zwischen den einzelnen Metaboliten wurde die Bildung der Stoffwechselprodukte über eine Inkubationszeit von 15 Tagen verfolgt:

42 Stunden nach Animpfen der Nährlösungen, dem Zeitpunkt, wo die ersten Mycelspuren sichtbar waren, wurde die erste Probe des Kulturansatzes aufgearbeitet. Weitere Proben wurden alle 24 Stunden analysiert. Wie in den frühern Ansätzen wurden die Kulturbrühen der Proben mit Essigester extrahiert. Die gewonnenen Rohextrakte wurden im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Bestimmung des Gehaltes an Gentisinacetal (10) und Chlorogentisinalkohol (13) erfolgte semiquantitativ durch Dünnschichtchromatographie. Die Sichtbarkeitsgrenze der beiden Metabolite liegt im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Methylenchlorid-Methanol-(96:4))nach Entwicklung mit Jod-Dampf bei 0,5 γ. Vom Rohextrakt wurden Verdünnungsreihen in Äthanol

---

5) Hefeextrakt und Pepton, Bestandteile der Nährlösungen von Phoma Stamm S 729, ergaben mit $AgNO_3$-Lösung einen starken, Malzextrakt einen schwachen Niederschlag von AgCl.

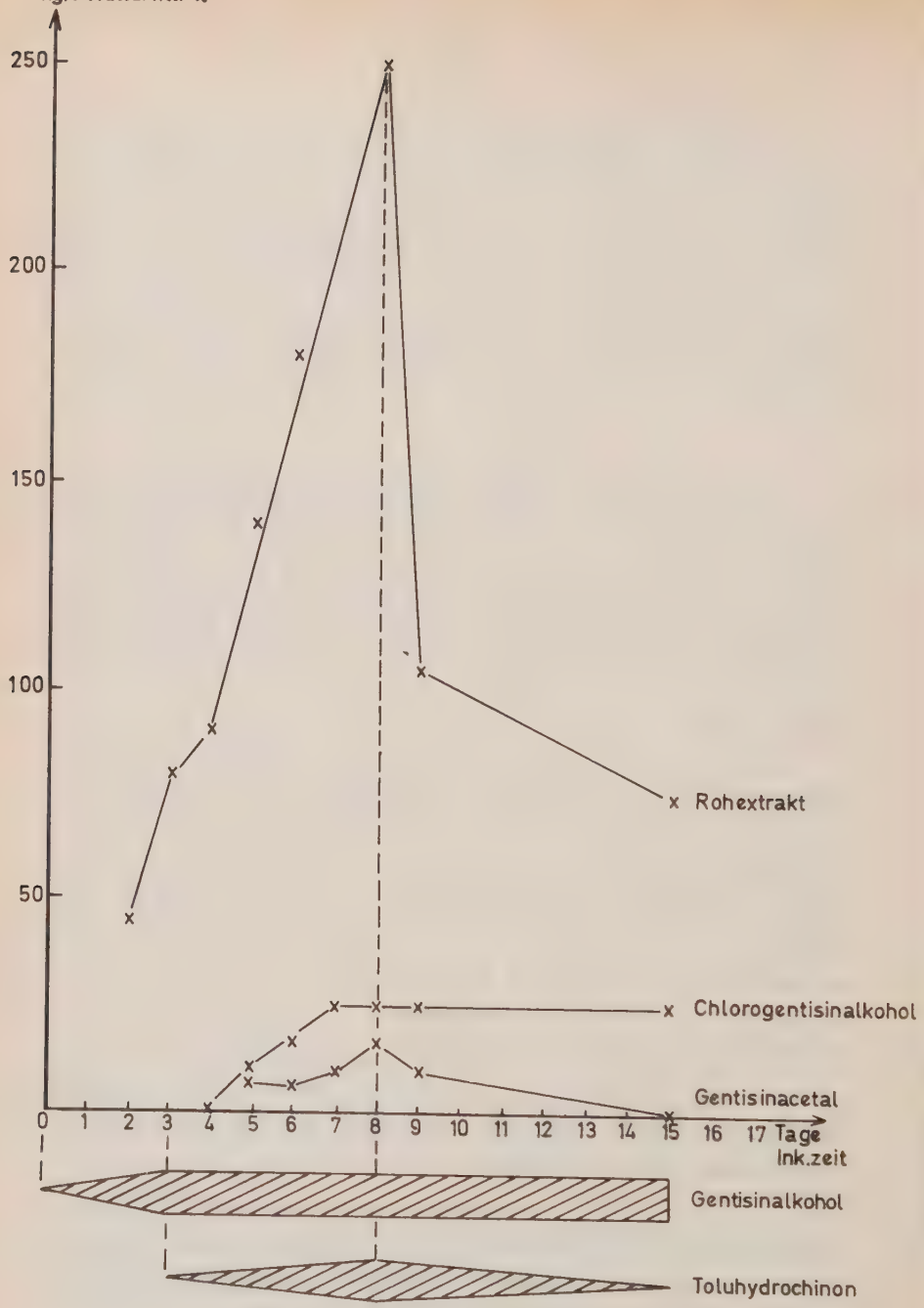
hergestellt und definierte Extraktmengen aufgetragen. Die Flecke wurden nach Anfärbeintensität in Jod mit Standardlösungen der beiden Metabolite verglichen (aufgetragene Menge der Standardsubstanz: 0,5 γ). Auf diese Weise war ein recht empfindlicher quantitativer Vergleich möglich; der Gehalt an Gentisinacetal (10) bzw. Chlorogentisinalkohol (13) konnte mit einer Genauigkeit von ± 5 % bestimmt werden. Die spätere Aufarbeitung der vereinigten Rohextrakte bestätigte diese Fehlergrenze.

Wie aus Figur 12 ersichtlich ist, wird die grösste Menge an Rohextrakt nach ca. 8 Tagen Inkubationszeit erhalten; später nahmen die Extraktmengen stark ab. Der Gehalt an Gentisinacetal (10) war am 8. Tag am grössten, später wird der Metabolit abgebaut. Chlorogentisinalkohol (13) erreicht nach ca. 7 Tagen die maximale Menge und bleibt dann mit konstantem Gewichtsanteil vertreten. Die Bildung dieser beiden Metabolite setzt zwischen dem 4. und 5. Tag ein.

Nur nach Intensität der Flecke, ohne Vergleich mit Standardmengen, wurde der Gehalt an Gentisinalkohol (3) bzw. Toluhydrochinon (9) in den verschiedenen Extrakten untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Gentisinalkohol (3) bereits nach 2 Tagen Inkubationszeit gefunden wird und vom 3. Tag an einen konstanten Anteil aufweist. Die Bildung von 9 setzt erst ca. am 3. Tag ein und erreicht am 8. Tag ein Maximum. Später scheint der Metabolit abgebaut zu werden.

Der beste Zeitpunkt für eine Ernte von Phoma Stamm S 729 ist nach den Resultaten der 8. Tag nach Animpfen der Nährlösungen. Nach dieser Inkubationszeit werden alle beschriebenen Metabolite in maximaler Ausbeute erhalten.

Aus 6 Liter Kulturlösung eines Kulturansatzes, dessen Inkubationszeit 11 Tage betrug, bei gleichen übrigen Bedingungen wie bei den frühern Ansätzen, wurden nach Chromatographie an Kieselgel und Umkristallisieren aus Methanol 2 mg gelblich-


mg/l Kulturfiltrat
250
200
150
100
50
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 Tage
Ink.zeit
Rohextrakt
Chlorogentisinalkohol
Gentisinacetal
Gentisinalkohol
Toluhydrochinon

FIGUR 12

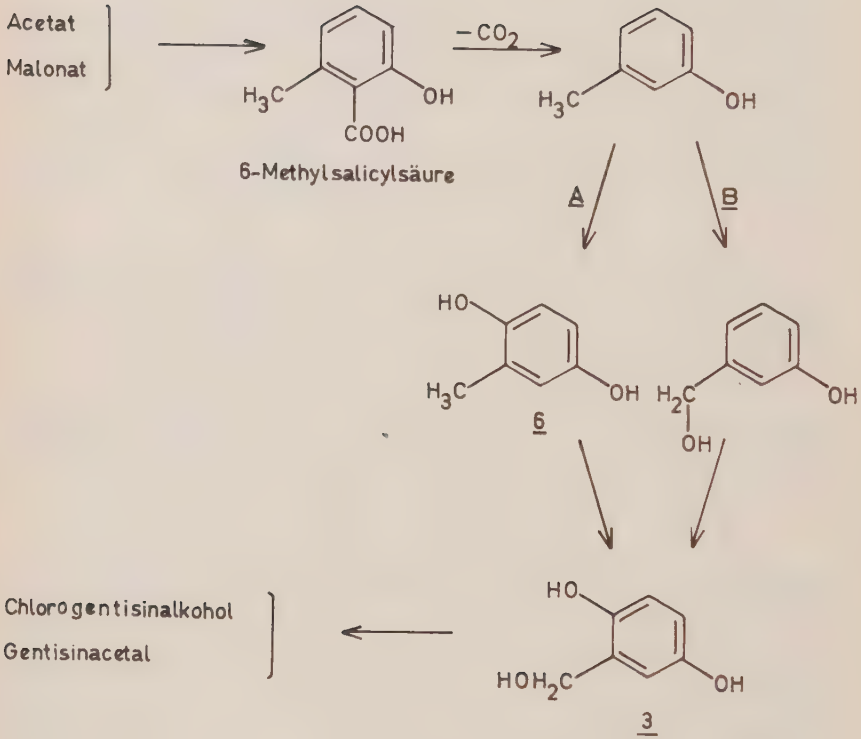
weisse Kristalle vom Schmelzpunkt 155 - 160° erhalten. Das hochaufgelöste Massenspektrum ergab eine Masse von 396,3393 (± 5 ppm), welche für die Summenformel $C_{28}H_{44}O$ (Masse: 396,3392) zutrifft. Der Rf-Wert des Dünnschichtchromatogramms und das IR.-Spektrum waren identisch mit demjenigen von Ergosterin. Weitere Versuche konnten mit dem Metaboliten in Ermangelung von genügend Substanz nicht durchgeführt werden. Da Ergosterol häufig als Metabolit in Pilzen gefunden wird, nehmen wir an, dass auch hier dieses Steroid vorliegt.

Zum Schluss soll versucht werden, einen hypothetischen Biosyntheseweg für die isolierten Sekundärmetabolite der Phoma spec. Stamm S 729 zu formulieren (vgl. Formelschema 9).

Nach Scott & Yalpani [9] bilden sich Toluhydrochinon (9) bzw. Gentisinalkohol (3) aus Acetat- resp. Malonat-Einheiten, mit 6-Methylsalicylsäure als Zwischenprodukt. Dieser Weg ergab sich aus den Studien über die Biosynthese des Patulins.

Aus der Bildungskurve (vgl. Figur 12) ist zu entnehmen, dass der Gentisinalkohol (3) vor dem Toluhydrochinon (9) gebildet wird, dass also möglicherweise zur Bildung von 3 Weg B via m-Hydroxy-benzylalkohol eingeschlagen wird, bis genügend 9 als Zwischenstufe vorhanden ist.Auf diese Weise wäre die Abnahme des Toluhydrochinons (9) nach einer gewissen Inkubationszeit zu erklären. Da kein Ansatz vor dem 7. Tag des Wachstums geerntet wurde und nie m- Hydroxy-benzylalkohol isoliert wurde, können diese Vermutungen nicht näher belegt werden.

Von Gentisinalkohol (3) aus wäre dann der Einbau von Chlor, das aus dem in der Nährlösung enthaltenen Chlorid stammen muss, anzunehmen, bzw. könnte durch Einbau einer weiteren Acetat-Einheit das Gentisinacetal (10) gebildet werden. Das gleichzeitige Auftreten von 10 und 13 bei der Bildung der Stoffwechselprodukte spricht für diese Annahme. Während Chlorogentisinalkohol (13) nach Erreichen des Maximalwertes in konstanten Mengen im Rohextrakt vorhanden bleibt, wird das Acetal (10) abgebaut.



FORMELSCHEMA 9

Da keine grösseren Mengen eines neuen Metaboliten bei längerer Inkubationszeit isoliert wurden, wäre ein Abbau von 10 zu Gentisinalkohol (3) denkbar. (Die zusätzlich entstehende Menge von 3 wäre im Dünnschichtchromatogramm bei der bereits vorhandenen hohen Konzentration an Gentisinalkohol nicht sichtbar).

5. Die antimikrobielle Aktivität von Gentisinacetal und Chlorogentisinalkohol

Die beiden neuen Stoffwechselprodukte Gentisinacetal (10) und Chlorogentisinalkohol (13) wurden auf ihre antimikrobielle Wirksamkeit untersucht [6]. In methanolische Lösungen der Metabolite mit Konzentrationen von 1000, 100 und 10 γ/ml wurden Filterpapierrondellen eingetaucht und diese nach Verdunstung des Methanols auf Testplatten ausgelegt. Wie Tabelle 3 zeigt, waren antibiotische Aktivitäten nur in hohen Konzentrationen gegen B. subtilis, S. aronson und S. aureus (nur Chlorogentisinalkohol) nachweisbar. Gentisinalkohol (3) bewirkt vergleichsweise eine beinahe vollständige Wachstumshemmung von Staphylococcus aureus bei einer Konzentration von 1:500, eine partielle Hemmung bei 1:1000 und 1:200 und zeigt keine antimikrobielle Wirksamkeit bei einer Konzentration von 1:4000 [8].

---

6) Wir danken Herrn Dr. H. Kobel, Sandoz A.G., für die biologische Prüfung.

Tabelle 3:

Testorganismen	Hemmhofdurchmesser in mm					
	Gentisinacetal			Chlorogentisin-alkohol		
	Konz. γ/ml			Konz. γ/ml		
	1000 1:10^3	100 1:10^4	10 1:10^5	1000 1:10^3	100 1:10^4	10 1:10^5
Staph.aureus	o	o	o	10	o	o
Staph.aureus(Penic.resist.)	o	o	o	8	o	o
Bacillus subtilis	10	o	o	18	12	o
Strept.aronson	o	o	o	18	o	o
Salm. typhimurium	o	o	o	o	o	o
Shigella flexneri	o	o	o	o	o	o
Proteus mirabilis	o	o	o	o	o	o
Escherichia coli	o	o	o	o	o	o
Pseudomonas aeroginosa	o	o	o	o	o	o
Saccharomyces cerevisiae	o	o	o	o	o	o
Candida albicans	o	o	o	o	o	o
Candida tropicalis	o	o	o	o	o	o

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem Koflerblock bestimmt und sind korrigiert; Fehlergrenze etwa $\pm$ 2°.

Substanzproben zur Messung der IR.-, UV.-, NMR.- und Massenspektren wurden während mindestens 2 Std. bei 0,02 Torr und, wenn nicht anders angegeben, bei 60° getrocknet. Substanzproben für die Elementaranalyse wurden bei 0,02 Torr bei angegebener Zeit und Temp. getrocknet. Die Mikroanalysen verdanken wir dem Mikroanalytischen Labor des Instituts für Organische Chemie (Leitung E. Thommen).

Zur Säulenchromatographie nach der Durchlaufmethode [25] dienten "Kieselgel 0,05 - 0,20 mm für die Chromatographie" der Firma E. Merck A.G., Darmstadt und neutrales Al_2O_3 der Aktivitätsstufe I der Firma M. Woelm, Eschwege, und für die präparative Dünnschichtchromatographie "Kieselgel PF 254 für die präparative Schichtchromatographie" von Merck. Für die Dünnschichtchromatographie nach Stahl [26] wurde "Kieselgel G nach Stahl für die Dünnschichtchromatographie" von Merck verwendet, unter Zusatz von Zinksilikat als Fluoreszenzindikator.

Als Fliessmittel dienten vorwiegend Gemische von Methylenchlorid mit 1 - 15 % Methanol. Wenn kein spezifisches Sprühreagens zur Verfügung stand, wurden die Substanzflecke in einer Kammer mit Jod-Dämpfen entwickelt.

Die 60 MHz-NMR.-Spektren wurden mit einem Varian-A-60-Spektrometer im Spektrallabor des Instituts für Organische Chemie (K. Aegerter) aufgenommen. Die 100 MHz-NMR.-Spektren wurden im Institut für Physikalische Chemie auf einem Varian HA-100 D-Spektrometer (H. Huber) aufgenommen. Die IR.-Spektren

wurden mit einem Beckman-IR-8-Spektrophotometer gemessen. Zur Aufnahme der UV.-Spektren diente ein Beckman D.K.2-Spektrophotometer. Die Massenspektren verdanken wir Herrn Dr.W. Vetter, Fa. F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel. Sie wurden auf einem MS-9 Gerät der AEI vermessen.

2. Züchtung und Extraktion der Stämme S 455, S 567, S 625, S 729, S 749, S 1527, S 1638, S 2276, S 2975 und S 3209 von Phoma spec.

Sämtliche Stämme wurden zunächst ab Schrägagarkulturen [7] auf dieselben Medien (vgl. Tabelle 1) entweder in Röhrchen oder in 100 ml-Erlenmeyer überimpft. Nach erfolgtem Wachstum bei den angegebenen Bedingungen wurden die Kulturen mit je 8 ml einer 0,01-proz. sterilen Natriumlaurylsulfonat-Lösung aufgeschwemmt und mit 50 ml sterilem, entmineralisiertem Wasser verdünnt.

Pro Stamm wurden 10 Erlenmeyer à 500 ml mit 100 ml Nährlösung [8] im Autoklaven sterilisiert und mit je 1 ml der obigen Sporensuspension beimpft. Die Züchtung erfolgte bei den in Tabelle 2 angegebenen Bedingungen.

Die Nährlösungen wurden von den Mycelien abfiltriert und die Mycelien noch dreimal mit je 150 ml Wasser gewaschen. Die Kulturfiltrate wurden mit je 400 ml Essigester extrahiert und die Essigesterphasen dreimal mit 150 ml Waschwasser der Mycelien gewaschen.

Nach Trocknen der Extrakte über Na_2SO_4, Filtration und Einengen am Vakuum erhielt man braune Oele.

Von den Rohextrakten wurden je 50 g auf Dünnschicht aufgetragen und in Methylenchlorid-Methanol-(9:1) bzw. Chloroform-Methanol-(95:15) laufen gelassen. Das Chromatogramm (vgl. Figur 1) wurde mit Jod entwickelt, für ein zweites Chromatogramm

(vgl. Figur 2) gelangte $FeCl_3$-Sprühreagens [9] zur Anwendung. Beim zweiten Chromatogramm wurden gleiche Resultate erzielt, wenn als Fliessmittel ein Gemisch von Methylenchlorid-Methanol-Eisessig-(89:10:1) verwendet wurde.

3. Bildungskurve der Metabolite (vgl. Figur 12)

Von einem Kulturansatz von Phoma sp. Stamm S 729 wurden ab 42 Std. nach Animpfen der Nährlösung während 15 Tagen alle 24 Std. je 4 Erlenmeyer à 100 ml Kulturlösung extrahiert.

400 ml Kulturbrühe wurden, nach Abtrennung vom Mycel, dreimal mit je 400 ml Essigester ausgeschüttelt; die Essigesterphasen wurden zweimal mit 100 ml Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und am Vakuum eingeengt. Die Rohextrakte wurden im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Vom Rohextrakt wurde eine Verdünnungsreihe in Äthanol hergestellt. Definierte Extraktmengen wurden im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Methylenchlorid-Methanol-(96:4)) untersucht und mit Standardlösungen von Gentisinacetal (10) und Chlorogentisinalkohol (13) in Bezug auf die Anfärbeintensität in Jod-Dampf verglichen.

---

7) Die Kulturen verdanken wir der Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie der Sandoz A.G., Basel (Dr. E. Haerri).

8) Pro Liter: 2 g KH_2PO_4 p.a., 2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ p.a., 2 g Malzextrakt, 2 g Hefeextrakt, 2 g Pepton, 20 g Glukose und entmineralisiertes Wasser.

9) 100 mg $FeCl_3$ werden in 1 ml Eisessig gelöst; danach wird mit konz. H_2SO_4 auf 100 ml aufgefüllt.

Herstellung der Standardlösungen

Je 5 mg von 10 und 13 wurden im Messkolben in 5 ml Äthanol gelöst, dann auf das 10-fache verdünnt. Von diesen Lösungen wurden 0,5 µl (≙ 0,5 γ Substanz) auf Dünnschicht aufgetragen. Diese Substanzmenge ergibt einen Fleck, dessen Farbintensität nach Entwicklung in Jod-Dampf an der Sichtbarkeitsgrenze liegt. Auf diese Weise kann sehr exakt mit entsprechenden Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Substanzen verglichen werden.

4. Isolierung der Metabolite von Phoma spec. Stamm S 729

5 Liter Nährlösung [8], verteilt auf 50 Erlenmeyer à 500 ml, wurden im Autoklaven sterilisiert und nach Abkühlen der Lösungen mit je 1 ml Sporensuspension von Stamm S 729 angeimpft. Die Kulturen wurden während neun Tagen als Standkulturen bei einer Temperatur von 27° inkubiert.

Zur Extraktion wurde die Kulturbrühe vom Mycel abfiltriert und das Mycel noch dreimal mit je 750 ml Wasser gewaschen. Das Kulturfiltrat wurde viermal mit je 4 Liter Essigester ausgerührt und der Essigester dreimal mit je 750 ml Waschwasser des Mycels gewaschen. Der Extrakt wurde filtriert, im Vakuum eingeengt, über Na_2SO_4 getrocknet und nochmals abfiltriert. Nach schonendem Abdampfen des Essigesters im Vakuum resultierten 6,1 g dunkelbrauner öliger Rohextrakt.

1,03 g Rohextrakt wurden in Methanol gelöst, mit wenig Kieselgel versetzt, im Vakuum vollständig vom Lösungsmittel befreit, auf 50 g Kieselgel aufgetragen und mit Methylenchlorid mit steigenden Mengen Methanol eluiert. Es wurden Fraktionen à 100 ml abgetrennt.

Die Fraktionen 4 - 5 (Lösungsmittel: Methylenchlorid-Methanol-(98:2)) ergaben 85 mg hellbraune Nadeln. Nach Umkristallisieren aus Chloroform-Äther und Sublimation bei 70° und 0,01 Torr resultierten 70 mg Toluhydrochinon (9) in farblosen Nadeln vom Smp. 119 - 121°.

In den Fraktionen 8 - 11 (Lösungsmittel: Methylenchlorid-Methanol-(96:4)) wurden 426 mg braune Kristalle erhalten. Nochmaliges Chromatographieren an der 100-fachen Menge Kieselgel und Umkristallisieren aus Äther-Petroläther ergaben 229 mg reinen Gentisinalkohol (3) vom Smp. 100,5 - 101°.

Ein weiterer Ansatz ergab aus 20 Litern Kulturfiltrat 28 g Rohextrakt. Dieser wurde, analog zum oben beschriebenen Versuch, an 1 kg Kieselgel chromatographiert. Als Lösungsmittel für die Fraktionen 11 - 30 diente ein Gemisch von Methylenchlorid-Methanol-(96:4). Die späteren Fraktionen wurden mit Methylenchlorid-Methanol-(95:5) eluiert.

Die Fraktionen 12 - 15 ergaben 3,9 g Oel, welches nach einigen Tagen Ansätze zur Kristallisation zeigte. Das Rohprodukt wurde noch zweimal je an der 50-fachen Menge Kieselgel chromatographiert. Nach Umkristallisieren aus Cyclohexan-Methylenchlorid wurden 350 mg kristallines Gentisinacetal (10) vom Smp. 103 - 105° erhalten.

Die Fraktionen 16 - 19 enthielten vorwiegend Toluhydrochinon (9).

Aus den Fraktionen 22 - 30 fielen noch 1,7 g dunkelbraunes Oel an, das vereinzelte Kristalle enthielt. Nochmaliges Chromatographieren an 200 g Kieselgel und Umkristallisieren aus Benzol-Äther ergaben 553 mg kristallinen Chlorogentisinalkohol (13) vom Smp. 140 - 141,5°.

Die Fraktionen 32 - 44 enthielten zur Hauptsache Gentisinalkohol (3).

Bei den verschiedenen Kulturansätzen wurden im Durchschnitt die folgenden Mengen der reinen Metabolite gefunden:

Gentisinalkohol (3)	:	300 mg pro Liter Nährlösung
Toluhydrochinon (9)	:	100 mg " " "
Gentisinacetal (10)	:	15 mg " " "
Chlorogentisinalkohol (13)	:	25 mg " " "

Aus 6 Litern Kulturlösung eines Ansatzes, dessen Inkubationszeit 11 Tage betrug bei gleichen übrigen Bedingungen wie bei den frühern Ansätzen, wurden nach Chromatographie des Rohextraktes an der 100-fachen Menge Kieselgel (Eluens: Methylenchlorid) 4 mg einer hellbraunen kristallinen Substanz erhalten. Nach Umkristallisieren aus Methanol resultierten 2 mg gelblichweisse Kristalle vom Schmelzpunkt 155 - 160°. Im hochaufgelösten Massenspektrum wurde das Molekular-Ion bei m/e 396,3393 (± 5 ppm) gefunden, entsprechend der Summenformel $C_{28}H_{44}O$. Die Substanz war nach Dünnschichtchromatogramm und IR.-Spektrum mit authentischem Ergosterin identisch.

5. Charakterisierung der isolierten Stoffe

5.1. Gentisinalkohol (3)

Aus Äther-Petroläther und Methylenchlorid kristallisierte 3 in hellen, rötlich-braunen Nadeln vom Smp. 100,5 - 101°. Mit alkoholischer $FeCl_3$-Lösung gab 3 eine rasch verschwindende Blaufärbung.

Im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Chloroform-Methanol-(85:15)) entstand nach Besprühen mit $FeCl_3$-Reagens [9] eine charakteristische Braunfärbung des Substanzflecks (Rf = 0,4).

Der Metabolit war nach Mischschmelzpunkt, Dünnschichtchromatogramm und IR.-Spektrum identisch mit authentischem Gentisinalkohol.

Vom reinen Metaboliten und von der Vergleichssubstanz wurde je das Tri-O-benzoylderivat nach Brack [27] hergestellt. Die farblosen Nadeln wiesen einen Schmelzpunkt von 124,5 - 125° auf.

Zur Analyse wurde das Benzoylderivat des Metaboliten 1 1/2 Std. bei 60° getrocknet.

$C_{28}H_{20}O_6$ (452,46) Ber. C 74,30 H 4,46 Gef. C 74,35 H 4,56 %

Die beiden Derivate waren nach Mischschmelzpunkt und Dünnschichtchromatogramm identisch.

5.2. Toluhydrochinon (9)

Der Metabolit kristallisierte aus "Äther-Pentan, "Äther-Petroläther und Chloroform-"Äther in farblosen Nadeln vom Smp. 119 - 121°, die sich nach längerem Stehen an Licht schwarzviolett verfärbten. Mit alkoholischer $FeCl_3$-Lösung entstand eine rasch verschwindende Rotfärbung.

Zur Analyse wurde 1 Std. bei 60° getrocknet.

$C_7H_8O_2$ (124,14) Ber. C 67,70 H 6,45 Gef. C 67,55 H 6,73 %

Der Metabolit war nach Mischschmelzpunkt, IR.-, UV.- und NMR.-Spektrum mit authentischem Toluhydrochinon, welches durch Reduktion von Toluchinon mit SO_2 in H_2O gewonnen worden war [28], identisch.

Vom Metaboliten und von der Vergleichssubstanz wurde durch Behandlung mit Benzoylchlorid in absolutem Pyridin [27] je das Dibenzoat hergestellt. Es wurde in farblosen Nadeln vom Smp. 130 - 132° erhalten. Der Mischschmelzpunkt der beiden Proben war unverändert. Die beiden Substanzen waren nach Dünnschichtchromatogramm, Massenspektrum und IR.-Spektrum identisch.

5.3. Gentisinacetal (10)

5.3.1. Charakterisierung

Gentisinacetal (10) kristallisiert aus Methylenchlorid-Cyclohexan in farblosen, zuweilen schwach rötlichen Nadeln vom Smp. 103 - 105°. Die Kristalle beginnen ab 95° zu sublimieren. Mit alkoholischer $FeCl_3$-Lösung ergaben sie eine Blaufärbung.

Im Massenspektrum (vgl. Formelschema 2) wurde das Molekular-Ion bei m/e 166 gefunden.

IR.-Spektrum (KBr, vgl. Figur 3) u.a. Banden bei 3500 - 3200 (OH); 2990, 2910, 2850 (CH_2 bzw. CH_3); 1610, 1585, 1490 (arom. C-C Streckschwingung); 1370 (CH_3); 1315, 1105, 1100, 1080 (Acetal); 1210, 1280 (Aryläther); 900, 840 und 790 cm^{-1}.

NMR.-Spektrum ($CDCl_3$, vgl. Figur 4)

Zur Analyse wurde 6 Std. bei 45° und 15 Torr getrocknet.

$C_9H_{10}O_3$ (166,18) Ber. C 65,51 H 6,03 Gef. C 65,54 H 6,17 %

5.3.2. Hydrolytische Spaltung

1. Versuch: Eine Lösung von 5 mg Gentisinacetal (10) in wenig Dioxan wurde mit 1 ml 2N-HCl unter leichtem Schütteln eine halbe Min. im heissen Wasserbad (ca. 70°) erwärmt.

Das Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsproduktes (Fliessmittel: Methylenchlorid-Methanol-(9:1)) zeigte nach Besprühen mit $FeCl_3$-Reagens [9] einen Fleck, der nach Farbe und Rf-Wert mit Gentisinalkohol (3) identisch war.

2. Versuch: Nachweis des Acetaldehyds:

Eine Lösung von 25 mg Gentisinacetal in wenig Dioxan wurde mit 2 ml 2N HCl während 45 Min. im Oelbad auf 140° erhitzt. Die Dämpfe wurden direkt in eine Vorlage von ca. 5ml Dimedon-Lösung [10] destilliert. Nach Stehen während 2 Std. zeigte sich eine schwache Trübung in der Vorlage. Die Lösung wurde anschliessend 2 Min. auf dem Wasserbad (ca. 70°) erwärmt, mit H_2O verdünnt und zweimal mit Äther ausgeschüttelt. Nach Eindampfen der Lösung erhielt man ein gelbes Oel.

Das Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsproduktes (Fliessmittel: Methylenchlorid-Methanol-(995:5)) zeigte einen Fleck, der wie Acetaldimedon (11) lief.

Das erhaltene Produkt wurde in 2 ml Äthanol gelöst, mit

---

10) 540 mg Dimedon in 10 ml Äthanol und 15 ml Wasser

4 Tropfen konz. HCl versetzt und 5 Min. auf dem Wasserbad (ca. 70°) erwärmt. Das Gemisch wurde danach mit Wasser verdünnt und zweimal mit Äther extrahiert. Nach Trocknen mit $CaCl_2$ und Eindampfen resultierten 4 mg eines gelben Oels, welches nach zweimaliger Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie Ansätze zur Kristallisation zeigte. Die Substanz liess sich nicht umkristallisieren.

Das Dünnschichtchromatogramm des Produktes in Methylenchlorid-Methanol-(995:5) bzw. Benzol-Äther-(7:3) enthielt einen Fleck, der mit Acetaldimedonanhydrid (12) identisch war.

Das Massenspektrum wies das Molekular-Ion bei m/e 288 auf und war mit demjenigen von authentischem Acetaldimedonanhydrid (12) identisch.

5.3.3. Synthese von Gentisinacetal (10)

Eine Lösung von 108 mg Gentisinalkohol (10) in 10 ml frisch destilliertem Acetaldehyd wurde mit 2 Tropfen konz. H_2SO_4 versetzt, worauf Erwärmung und eine sofortige Gelbfärbung eintraten. Nach ca. einer Min. schied sich ein braunes Oel ab. Das Reaktionsgemisch wurde während 3 Std. bei 0° stehen gelassen, dann, nach Zugabe von Wasser, 3-mal mit Äther, 3-mal mit 2N Sodalösung und wieder 3-mal mit Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen erhielt man 250 mg eines gelben Oels.

Das Rohprodukt wurde an 50 g Kieselgel mit einem Gemisch von Methylenchlorid-Methanol-(995:5) als Eluens chromatographiert. Die Fraktionen 10 - 12 ergaben farblose Kristalle, die nach Umkristallisieren aus Methylenchlorid-Cyclohexan bei 103 - 105° schmolzen. Sie waren nach Mischschmelzpunkt, Dünnschichtchromatogramm, IR.- und NMR.-Spektrum mit Gentisinacetal(10) identisch.

Die Säurespaltung des synthetischen Präparats und das Ueberführen der gasförmigen Produkte in Dimedon-Lösung [10]

ergaben farblose Kristalle vom Schmelzpunkt 174 - 178°, die nach Mischschmelzpunkt und Dünnschichtchromatogramm mit Acetaldimedon (11) identisch waren. Durch Kochen mit Säure entstand das entsprechende Anhydrid (12) vom Smp. 136 - 138°.

5.4. Chlorogentisinalkohol (13)

Chlorogentisinalkohol (13) kristallisiert aus Äther-Benzol bzw. Äther-Cyclohexan in schwach rötlichen Nadeln vom Smp. 140 - 141,5°. Bei starker Lichteinwirkung verfärben sich die Kristalle grau bis schwarz.

Mit alkoholischer $FeCl_3$-Lösung gaben sie eine vorübergehende Blaufärbung.

Der Beilsteintest war positiv.

Im Massenspektrum (vgl. Formelschema 6) wurde das Molekular-Ion bei m/e 174 gefunden.

IR.-Spektrum (KBr, vgl.Figur 5) u.a. Banden bei: 3600 - 2980 (OH); 1600, 1480 (arom. C-C-Streckschwingung); 1305, 1230, 1165, 1115, 1030, 980, 880, 860, 840 und 790 (Cl) cm^{-1}.

NMR.-Spektren ($(CD_3)_2CO$ und $(CD_3)_2SO$, vgl. Figur 6).

Zur Analyse wurde 3 Std. bei 25° und 0,01 Torr getrocknet.

$C_7H_7O_3Cl$ (174,59) Ber. C 48,15 H 4,04 Gef. C 48,13 H 4,11 %

6. Synthese der drei isomeren Chlorogentisinalkohole (13, 17 und 18)

6.1. Die drei isomeren Chlorogentisinaldehyde: 2,5-Dihydroxy--6-chlor-benzaldehyd (14), 2,5-Dihydroxy-4-chlor-benzaldehyd (15) und 2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzaldehyd (16)

In einem 250 ml Sulfierkolben mit mechanischem Rührer und Intensivkühler wurden 25 g NaOH (0,625 Mol) in 25 ml ausgekochtem destilliertem Wasser gelöst und mit N_2 gesättigt (Trocknung des Stickstoffes mit konz. H_2SO_4, O_2-Entfernung mit einer

Lösung von 7,5 g Pyrogallol in 22,5 ml ausgekochtem Wasser, vermischt mit 180 g KOH in 120 ml ausgekochtem Wasser), worauf unter stetem Rühren und im N_2-Strom eine Lösung von 10 g Chlorhydrochinon (Fluka; puriss.) (0,106 Mol) in 10 ml ausgekochtem Wasser zugegeben wurde. Nach Kühlung des Reaktionsgemisches im Eisbad wurden portionenweise mit 30 ml (22,5 g) Chloroform (0,182 Mol) versetzt. Eine schwache Erwärmung trat ein. Danach wurde das Gemisch auf Siedetemperatur gebracht und unter stetem N_2-Strom und ständigem Rühren während 8,5 Std. gekocht. In Abständen von 2 Std. wurden je ca. 30 ml Chloroform zugegeben, um entwichenes Reagens zu ersetzen. Die ganze Reaktion erfolgte unter Lichtausschluss.

Anschliessend wurde das dunkelbraune Produkt mit ca. 100 ml 4N H_2SO_4 auf pH 5 gestellt und 3-mal mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösungen wurden 2-mal mit Wasser gewaschen und über $CaCl_2$ getrocknet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels erhielt man 18 g eines dunkelbraunen Oels.

Das gesamte Rohprodukt wurde an 500 g Kieselgel (Lösungsmittel: Methylenchlorid) chromatographiert.

Aus den Fraktionen 7 - 11 wurden nach zweimaliger Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie (Fliessmittel: Methylenchlorid-Methanol-(93:7)) und nach Umkristallisieren aus Methylenchlorid 250 mg 2,5-Dihydroxy-6-chlor-benzaldehyd (14) in orange-gelben Nadeln vom Smp. 144 - 147° gewonnen.

Im Dünnschichtchromatogramm (Fliessmittel: Methylenchlorid-Methanol-(96:4)) wies der Substanzfleck nach Entwicklung mit Jod eine braunrote Farbe auf.

Im Massenspektrum (vgl. Formelschema 8) wurde das Molekular-Ion bei m/e 172 gefunden.

IR.-Spektrum (KBr) u.a. Banden bei: 3500 - 3000 (OH); 1635 (CO); 1585, 1460, 1350, 1290, 1240, 1175, 1155, 886, 830 und 788 cm^{-1}.

NMR.-Spektrum ($(CD_3)_2CO$, vgl. Figur 7)

Die Fraktionen 12 - 16 ergaben nach analoger Aufarbeitung 138 mg 2,5-Dihydroxy-4-chlor-benzaldehyd (15), der aus Methylenchlorid hellgelbe Oktaeder vom Smp. 172 - 174° lieferte.

Im Dünnschichtchromatogramm wurde der Substanzfleck bei Entwicklung mit Jod graubraun angefärbt.

Im Massenspektrum wurde das Molekular-Ion bei m/e 172 gefunden.

IR.-Spektrum (KBr) u.a. Banden bei: 3500 - 2900 (OH); 1645 (CO); 1585, 1555, 1480, 1450, 1355, 1285, 1240, 1190, 1150, 1018, 930, 885, 870, 820 und 795 cm^{-1}.

NMR.-Spektrum ($(CD_3)_2CO$, vgl. Figur 8).

Aus den Fraktionen 22 - 38 resultierten nach der wie oben beschriebenen Reinigung 85 mg 2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzaldehyd (16) in hellgelben Kristallen vom Smp. 120 - 129° (aus Methylenchlorid). Wie aus Dünnschichtchromatogramm und Spektren ersichtlich wurde, waren die Kristalle noch stark mit 1-Chlor-2-Hydroxybenzaldehyd verunreinigt.

Im Massenspektrum wurde das Molekular-Ion bei m/e 172 (neben m/e 156 als Molekular-Ion von 1-Chlor-2-Hydroxybenzaldehyd) gefunden.

IR.-Spektrum (KBr) u.a. Banden bei: 3500 - 2900, 1655 (CO); 1600, 1570, 1445, 1360, 1280, 1230, 1130, 1040, 985, 920, 870, 860 und 810 cm^{-1}.

NMR.-Spektrum ($(CD_3)_2CO$, vgl. Figur 9).

Neben den Aldehyden wurde viel Chlorhydrochinon zurückgewonnen. Die Ausbeute, berechnet auf die Gesamtmenge der drei isomeren Aldehyde (ca. 440 mg, wenn für die Ausbeute an reinem 16 50 mg eingesetzt werden) betrug ungefähr 5 % der Theorie.

Wurde die Synthese nicht in N_2-Atmosphäre bei einer Reaktionszeit von nur 1 Std. durchgeführt, konnte kein Aldehyd ge-

wonnen werden.

Weitere Syntheseversuche

1. In eine Lösung von 5 g Chlorhydrochinon in 50 ml abs. Äther mit 10 g $Zn(CN)_2$ wurde während 2 Std. unter Rühren trockenes HCl-Gas eingeleitet. Nach Hydrolyse und Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurde Chlorhydrochinon quantitativ zurückerhalten.

2. In eine Lösung von 5 g Chlorhydrochinon in 50 ml abs. Benzol mit 6,4 g $Zn(CN)_2$ wurde während 5 Std. trockenes HCl-Gas eingeleitet. Sobald die Lösung mit HCl gesättigt war, wurden 5,8 g $AlCl_3$ portionenweise zugegeben. Nach Erwärmen, Hydrolyse und Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurde nur Ausgangsmaterial zurückgewonnen.

3. 5 g Chlorhydrochinon in 15 ml N-Methylformanilid wurden mit N_2 gesättigt und unter Eiskühlung mit 5 ml $POCl_3$ versetzt. Die Mischung wurde 1 Std. bei 20° und 5 Std. bei 60° gerührt. Nach Hydrolyse mit 50 ml Eiswasser, Einstellung des Gemisches auf pH 6 mit 6$\underline{N}$ NaOH und Aufarbeitung wurden 100 % des Eduktes zurückerhalten.

6.2. Die drei isomeren Chlorogentisinalkohole: 2,5-Dihydroxy-6-chlor-benzylalkohol (17), 2,5-Dihydroxy-4-chlor-benzylalkohol (18) und 2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzylalkohol (13)

Je 20 mg (0,116 mMol) von Verbindung 14, 15 und 16 wurden in 5 ml Dioxan-Wasser-(4:1) gelöst und mit ca. 50 mg $NaBH_4$ (1,32 mMol) versetzt. Die anfänglich gelbe Lösung entfärbte sich bei der $NaBH_4$-Zugabe spontan. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Zimmertemp. stehengelassen, danach mit 4$\underline{N}$ H_2SO_4 kongosauer gestellt, mit Wasser verdünnt und nochmals eine Std. stehengelassen. Nach dreimaligem Ausschütteln mit Äther, Waschen mit Wasser, Trocknen mit Na_2SO_4 und Eindampfen resultier-

ten je 15 mg braunes Rohprodukt.

Es wurde durch zweimalige präparative Dünnschichtchromatographie gereinigt (Fliessmittel: Methylenchlorid-Methanol-(9:1)). Aus Chloroform bzw. Benzol wurden je ca. 11 mg helle, rötlichbraune Nadeln erhalten.

Die Produkte besassen die folgenden physikalischen Eigenschaften:

1. 2,5-Dihydroxy-6-chlor-benzylalkohol (17): Smp. 128 - 129°.

Im Massenspektrum trat das Molekular-Ion bei m/e 174 auf.

IR.-Spektrum (KBr) u.a. Banden bei: 3500, 3380, 3000, 2910, 2860, 1610, 1500, 1445, 1340, 1290, 1265, 1195, 1130, 1010, 980, 970, 845, 820 und 765 cm^{-1}.

NMR.-Spektrum ($(CD_3)_2CO$, vgl. Figur 10).

2. 2,5-Dihydroxy-4-chlor-benzylalkohol (18): Smp. 135°.

Im Massenspektrum wurde das Molekular-Ion bei m/e 174 gefunden.

IR.-Spektrum (KBr) u.a. Banden bei: 3600 - 3000, 2960, 2910, 1620, 1600, 1500, 1425, 1320, 1230, 1190, 1020, 960, 870, 845, 820 und 750 cm^{-1}.

NMR.-Spektrum ($(CD_3)_2$ CO, vgl. Figur 11)

3. 2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzylalkohol (13): Smp. 141 - 142°.

Die Kristalle waren nach Mischschmelzpunkt, Dünnschichtchromatogramm, IR.-, NMR.- und Massenspektrum mit dem Metaboliten Chlorogentisinalkohol identisch.

Eine Lösung von 22 mg 13 in 20 ml Äthanol, mit 22 mg 10-proz. Pd-C als Katalysator während 50 Min. hydriert, ergab 20 mg braunes Oel, welches im Dünnschichtchromatogramm ca. 10 verschiedene Flecke aufwies.

C. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Kulturen einer Phoma spec. wurden 1966 die Antibiotica Phomin und 5-Dehydro-phomin isoliert und ihre Struktur aufgeklärt.

In der Absicht, mit Phomin und 5-Dehydro-phomin strukturell verwandte Metabolite zu finden, die weiteren Aufschluss über die Biogenese dieser Antibiotica erteilen würden, wurden zehn Stämme des Mikroorganismus Phoma gezüchtet und die Kulturbrühen vor allem auf den Gehalt an Phomin (7), 5-Dehydro-phomin (8), aber auch auf die weiteren bisher aus Phoma-Arten isolierten Metabolite geprüft. Die Dünnschichtchromatogramme der Rohextrakte zeigten, dass von keinem der untersuchten Pilzstämme Phomin und 5-Dehydro-phomin gebildet werden. Das Chromatogramm des Rohextraktes von Stamm S 729 hingegen liess die Anwesenheit von Gentisinalkohol (3) und weiterer Metabolite vermuten. Die Untersuchungen konzentrierten sich daher auf Phoma spec. Stamm S 729.

Aus dem Essigesterextrakt der Kulturbrühen konnten vier Stoffwechselprodukte isoliert werden: Gentisinalkohol (3), Toluhydrochinon (9) und die neuen Verbindungen Gentisinacetal (10) und Chlorogentisinalkohol (13). In sehr geringer Ausbeute wurde ein weiterer Metabolit isoliert, der nach Massenspektrum und Dünnschichtchromatogramm mit Ergosterol identisch war.

Die Struktur von Gentisinacetal wurde durch eine hydrolytische Spaltung und durch Synthese bewiesen. Gentisinacetal gehört zu den wenigen Beispielen von Pilzmetaboliten, die eine Acetalgruppierung enthalten.

Zur Sicherstellung der Struktur von Chlorogentisinalkohol wurden aus Chlorhydrochinon die drei bisher in der Literatur nicht beschriebenen isomeren Chlorgentisinaldehyde, nämlich 2,5-Dihydroxy-6-chlor-benzaldehyd (14), 2,5-Dihydroxy-4-chlor--benzaldehyd (15) und 2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzaldehyd (16)

nach der Methode von Reimer-Tiemann hergestellt. Reduktion der drei isomeren Aldehyde 14, 15 und 16 mit $NaBH_4$ lieferte die entsprechenden Alkohole, nämlich den 2,5-Dihydroxy-6-chlor-benzylalkohol (17), 2,5-Dihydroxy-4-chlor-benzylalkohol (18) und 2,5-Dihydroxy-3-chlor-benzylalkohol (13). Die isomeren Aldehyde und Alkohole wurden spektroskopisch genau untersucht. Der isolierte Chlorogentisinalkohol war mit 2,5-Dihydroxy-3--chlor-benzylalkohol (13) identisch.

Von den Stoffwechselprodukten wurde eine Bildungskurve aufgenommen. Aus dieser liess sich eine Hypothese über die biogenetischen Zusammenhänge zwischen den Metaboliten von Phoma sp. Stamm S 729 ableiten.

Die biologische Prüfung von Gentisinacetal und Chlorogentisinalkohol ergab für die beiden neuen Stoffe eine schwache antimikrobielle Wirksamkeit, die mit derjenigen von Gentisinalkohol vergleichbar ist.

D. LITERATURVERZEICHNIS

[1] F. Koegl & J. Sparenburg, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 59, 1180 (1940). F. Koegl & F.W. Quackenbush, ibid. 63, 251 (1944). F. Koegl, G.C. Wessem & O.J. Elsbach, ibid. 64, 23 (1945). A.J. Birch, D.N. Butler & R.W. Rickards, Tetr. Letters 1964, 1853.

[2] D.E. Wright & K. Schofield, Nature 188, 233 (1960).

[3] A. Closse, R. Mauli & H.P. Sigg, Helv. 49, 204 (1966).

[4] M. Binder, Dissertation Basel, 1969.

[5] W. Rothweiler & Ch. Tamm, Experientia 22, 750 (1966).

[6] J.-R. Kiechel, Dissertation Basel, 1969.

[7] Privatmitteilung von Dr. H.P. Sigg, Sandoz A.G., Basel.

[8] J.H. Birkinshaw, A. Bracken & H. Raistrick, Biochem. J. 37, 726 (1943).

[9] A.I.Scott & M. Yalpani, Chem. Comm. 1967, 945.

[10] D.H. Williams & I.Fleming, "Spectroscopic Methods in Organic Chemistry" (1966).

[11] J. Böeseken & F. Tellegen, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 57, 133 (1938).

[12] A.I. Vogel, "Practical Organic Chemistry" (London 1962).

[13] P. Traxler, Dissertation Basel, 1970.

[14] M.A.P. Meisinger, F.A. Kuehl Jr., E.L. Rickes, Norman G. Brink et al., JACS 81, 4979 (1959).

[15] T.E. Eble, C.M. Large, W.H. DeVries, G.F. Crum & J.W. Shell, Antibiot. Ann., 893 (1955-1956).

[16] K.L. Rinehardt Jr., J.R. Beck, W.W. Epstein & L.D. Spicer, JACS 85, 4035 (1963).

[17] O. Neubauer & L. Flatow, Z. physiol. Chem. 52, 380 (1907).

[18] J. Renz, Helv. 30, 124 (1947).

[19] "Organikum", 8.Auflage, Berlin 1968.

[20] J.F. Grove, J. MacMillan, T.P.C. Mulholland & M.A.R. Thorold, J. Chem. Soc. 1952, 3949, 3977.

[21] C.T. Calam, P.W. Clutterbuck, A.E. Oxford & H. Raistrick, Biochem. J. 41, 458 (1947).

[22] Th.E. Woodward & Ch. Wissemann, Med. Encyclop. Inc., New York, 1957.

[23] R.W.Broschard, A.C.Dornbush, S. Gordon, B.L. Hutchings et al., Science 109, 199 (1949).

[24] J.R. Beckwith & L P. Hager, J. Biol. Chem. 238, 3091 (1963).

[25] T. Reichstein & C.W. Shoppee, Discuss. Farad. Soc. 7, 305 (1949).

[26] E. Stahl, "Dünnschichtchromatographie", Springer Verlag, Berlin 1967.

[27] A. Brack, Helv. 30, 1 (1947).

[28] Gattermann, "Die Praxis des organischen Chemikers", 24. Auflage.

E. CURRICULUM VITAE

Am 1. Oktober 1943 wurde ich, Margareta Séquin-Frey, als Tochter des Maximilian Roland Frey, Feuerwehrangestellter, und seiner Gattin Linette geb. Bühlmayer, in Basel geboren.

Hier verbrachte ich meine Primarschulzeit (1950 - 1954) und besuchte anschliessend das Mädchengymnasium (Gymnasialabteilung). Im Frühjahr 1962 bestand ich die Maturität (Typus B) und begann gleich anschliessend das Studium der Chemie an der Universität Basel. Das 1. Vordiplomexamen legte ich im Herbst 1963 ab und die 2. Vordiplomprüfung, mit Zoologie als Wahlfach, im Frühjahr 1965. Das Diplom erwarb ich im Herbst 1966, worauf ich im November desselben Jahres unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ch. Tamm die Doktorarbeit begann.

Während der Semesterferien arbeitete ich zweimal als Volontärin in der chemischen Industrie: in der analytischen Abteilung der Firma Durand & Huguenin A.G. und in der koloristischen Abteilung der Firma Sandoz A.G., Basel.

In den Jahren 1965 - 66 und 1967 - 69 war ich als feste Vikarin an den Mädchengymnasien I und II für die Fächer Chemie und Mathematik angestellt.

Im Oktober 1968 verheiratete ich mich mit Carlo Séquin, Physiker, von Basel und Thun BE.

Folgenden Herren Professoren und Dozenten verdanke ich meine Ausbildung:

E. Baumgartner, M. Brenner, P. Buchner, H. Erlenmeyer, S. Fallab, J. Gantner, M. Geiger-Huber, C. Grob, P. Huber, P. Leepin, A. Marxer, E. Miescher, R. Müller, H. Nüesch, A. Portmann, T. Reichstein, H. Reinhardt, P. Scherrer, P. Schiess, L. Schrade Ch. Tamm, M. Thürkauf, R. Wizinger.